

Producción y caracterización de un anticuerpo monoclonal que marca selectivamente la población astrocitaria en el sistema nervioso central

J.I. Gost, R. Insausti y L.M. Gonzalo

Departamento de Anatomía, Universidad de Navarra

Resumen Hemos desarrollado un anticuerpo monoclonal que marca astrocitos en las 3 especies de mamíferos (humano, mono y rata) testadas. Utilizamos como inmunógeno, tejido de hipocampo extraído de un cerebro humano después de su muerte. El examen neuropatológico del cerebro reveló una angiopatía congofílica. El tejido fue congelado hasta su homogeneización e inmunización por inyección del homogeneizado tisular en ratones de la cepa BALB/C de 8 semanas de vida. Se utilizó un protocolo estandarizado para la fusión de los linfocitos del bazo del ratón con células de mieloma NS-1 carentes de la enzima Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferasa (HGPRT⁻) obteniéndose hibridomas cuyos sobrenadantes fueron probados mediante tests ELISA, técnicas inmunocitoquímicas (PAP y ABC) y técnicas de inmunofluorescencia. El anticuerpo monoclonal obtenido es una IgM, y reconoce una proteína de 43.000 daltons, determinada ésta mediante Western blot. Las pruebas inmunohistoquímicas se realizaron en tejido nervioso humano fijado con paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0,02% mediante perfusión intracarotídea, y seccionado con un micrótopo de congelación a 30 ó 50 μ m. El tejido nervioso de mono se perfundió por vía transcardíaca sólo con paraformaldehído al 4%, siendo seccionado a 50 μ m. El tejido de rata que se fijó inicialmente siguiendo el mismo protocolo de perfusión que se empleó con el tejido de mono, dio mejores resultados cuando se fijó con una mezcla de para-

formaldehído al 1% más glutaraldehído al 1,25%, seccionándose a 30 μ m. El tejido humano fue también fijado, bien con formol tamponado al 10% o con paraformaldehído al 4%, e incluido posteriormente en parafina. Los cortes se intensificaron tras aplicar estas técnicas, con osmio-tiocarbohidrazida. La dilución óptima del anticuerpo se tituló en 1/50-1/100. En todas las especies probadas, los astrocitos, tanto fibrosos como protoplasmáticos, se marcaron intensamente, incluso en sus prolongaciones más finas, tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris. La perfusión de tejido de rata sólo con paraformaldehído al 4%, resultó en un escaso marcaje limitado tan sólo a la glía subpial y a la glía de Bergmann del cerebelo. Su perfusión con paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1,25% dio un marcaje similar al observado en el tejido humano y de mono. El marcaje resultó nulo en aquellos cortes incluidos en parafina y previamente fijados con formol al 10%; sin embargo, la fijación con paraformaldehído y su posterior inclusión en parafina dieron un marcaje similar al observado en cortes de tejido congelado. Este anticuerpo monoclonal presenta una alta especificidad para la población astrocitaria en el sistema nervioso de mamíferos, pudiendo ser útil en una gran variedad de estudios de situaciones normales y patológicas del sistema nervioso.

Summary The development of a monoclonal antibody that selectively labels the astrocytic population of the central

nervous system in the three species tested (human, monkey and rat) is described. The tissue used as immunogen consisted in a sector of the human hippocampus (CA1) from a brain removed shortly after death. The neuropathological examination in this case revealed an congophilic angiopathy. The tissue was frozen until homogeneization and intraperitoneal injection in 8 weeks old BALB/C mice, after which lymphocytes from the spleen were fused with NS-1 myeloma cells devoid of the enzyme Hypoxantine Guanine Phosphoribosyl Transferase (HPGT⁻) following standard procedures. The resulting hybridomas were tested by ELISA assays, immunofluorescence and immunohistochemical (PAP and ABC) techniques. The monoclonal antibody obtained was identified as an IgM and the Western blot analysis indicated that it recognizes a protein of 43,000 dalton. Immunohistochemistry was performed in 30 or 50 μ m sections of human temporal lobe perfused through the carotid arteries with a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.02% picric acid. Monkey tissue (sectioned at 50 μ m) was obtained from a brain with the same fixation. Rat tissue followed the same protocol, although better results were seen after shifting to 1% paraformaldehyde and 1.25% glutaraldehyde (sections were 30 μ m thick). Paraffin embedded human tissue (fixed in either 10% buffered formalin or in 4% paraformaldehyde) was also tested. All immunoreactions were intensified in a solution of osmium tetroxide and thiocarbonylhydrazide. The monoclonal antibody gave best results at a dilution of 1: 50-100, where it gave a sharp labeling of both fibrous and protoplasmic astrocytes up to the most delicate processes, both in white and the grey matter. Rat tissue fixed in only 4% paraformaldehyde resulted in less optimal labeling, mostly restricted to limiting glia and Bergmann glia. The other fixation protocol (1% paraformaldehyde and 1.25% glutaraldehyde) gave a labeling comparable to monkey and human tissue. Paraffin embedded tissue was positive and similar to that obtained in frozen tissue, only when used the 4% paraformaldehyde fixation, but not when it was fixed in 10% formalin. Therefore, this monoclonal antibody has high specificity for the astrocytic population in the nervous system of mammals and it can be useful in a variety of studies of the normal and pathological situations of the nervous system.

Introducción

Cuando una sustancia extraña penetra, o se inyecta, en el cuerpo de un vertebrado, uno de los aspectos de la consecuente respuesta inmune es la producción de anticuerpos por parte de ciertas células plasmáticas. Los anticuerpos son inmunoglobulinas con sitios de combinación que reconocen la forma de los deter-

minantes situados en la superficie del antígeno y se unen a ellos. La combinación del anticuerpo con el antígeno desencadena ciertos procesos capaces de neutralizar y eliminar la sustancia extraña.

Cuando se inyecta un agente inmunizante en un animal, éste responde elaborando anticuerpos dirigidos contra las diferentes moléculas antigénicas del material inyectado y contra los distintos determinantes de un solo antígeno; produciendo también diferentes anticuerpos que se acoplan, en mayor o menor grado, a un mismo determinante antigénico.

Clásicamente, los anticuerpos se producían por inmunización de un animal con un antígeno determinado, y posteriormente se purificaba el anticuerpo a partir del suero del animal inmunizado. La escasa especificidad de los antiseros obtenidos, limita sus aplicaciones como reactivos de inmunoensayos. Además, es difícil repetir las condiciones para la obtención de un antisuero de actividad definida, ya que es impredecible la reacción del animal, y variable el grado de calidad del inmunógeno.

La aplicación de un método de producción de anticuerpos basados en la tecnología del hibridoma (4, 5, 6, 11, 12, 13, 19) permitió la obtención de híbridos celulares con una capacidad ilimitada de proliferar y de producir constantemente un mismo anticuerpo. El desarrollo y aplicación de anticuerpos monoclonales (1, 2, 3, 7, 8, 22) ha contribuido, en gran medida, al descubrimiento de un alto número de determinantes antigénicos intracelulares o localizados en la superficie celular, característicos de diferentes tipos o subtipos celulares.

Los anticuerpos monoclonales detectan estructuras proteicas específicas, permitiendo profundizar en la estructura funcional de las neuronas. Por lo tanto, es posible establecer el diagnóstico de muchas enfermedades a nivel molecular, lo cual destaca como una de sus principales aplicaciones. Al mismo tiempo, son capaces de detectar antígenos en baja proporción y poblaciones celulares pequeñas, especialmente en aquellos casos en los que se emplean mezclas antigénicas complejas en la inmunización de animales.

Su empleo constituye una poderosa herramienta para la microdissección química, anatómica y funcional de sistemas complejos, como es el caso del sistema nervioso.

El sistema nervioso está compuesto por una mezcla de poblaciones celulares distintas, organizadas anatómicamente e interrelacionadas funcionalmente. Las técnicas morfológicas clásicas identifican neuro-

nas y células gliales, como las dos mayores poblaciones celulares del sistema nervioso.

Los anticuerpos monoclonales, capaces de reconocer un determinante antigénico único dentro de un complejo antigénico, han abierto una nueva etapa en el campo de la aproximación molecular al estudio del sistema nervioso.

La aplicación de las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales partiendo de tejido nervioso humano como inmunógeno se ha visto limitada por la dificultad en conseguir tejido nervioso humano fresco, y por su rápida autólisis postmortem, lo que requiere una rápida extracción y procesamiento del cerebro.

Nuestro trabajo ha ido encaminado básicamente a la obtención de un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer de forma específica alguna de las poblaciones celulares del sistema nervioso central, habiendo resultado un anticuerpo que marca selectivamente los astrocitos.

Clásicamente, la glía engloba dos grandes grupos fundamentales, la astrogliá y la oligodendrogliá. La astrogliá se ha dividido en dos subclases: los astrocitos fibrosos localizados preferentemente en la sustancia blanca, y que expresan, de forma característica, muchos filamentos gliales; y los astrocitos protoplasmáticos localizados fundamentalmente a nivel de la sustancia gris, y que expresan una pequeña cantidad de filamentos gliales.

Material y métodos

Extracción y preparación del cerebro

El tejido utilizado para la inmunización y posterior obtención del anticuerpo monoclonal, fue de una mujer de 98 años de edad que falleció sin afectación neurológica ni psiquiátrica. El estudio anatómopatológico reveló una angiopatía congófilica.

El cerebro se obtuvo 1 hora después del fallecimiento, se disecó el hipocampo y se extrajo el sector CA1 del hipocampo izquierdo, cortándose en fragmentos de un peso medio aproximado de 125 mg cada uno.

Homogeneización y preparación del inmunógeno

Dos de estos fragmentos se descongelaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se homogeneizaron en un homogenizador (Kinemática AG Polytron PT 300) durante 2 minutos.

Inmunización

Se inmunizaron 4 ratones hembra BALB/C de 8

semanas. El intervalo de tiempo entre cada inyección de recuerdo fue de 3 semanas.

En la primera inyección (día 0) se mezclaron 250 µl del homogeneizado tisular en solución acuosa con 250 µl de adyuvante completo de Freund (CFA), y se inyectaron por vía intraperitoneal.

El día 22 se inyectó la segunda inyección de recuerdo, mezclándose 250 µl del homogeneizado tisular en solución acuosa con 250 µl de adyuvante incompleto de Freund (IFA), y se inyectaron por vía intraperitoneal y subcutánea.

Los días 43 y 64 se repitieron las inyecciones a las mismas dosis y por las mismas vías.

El día 85 se administró la última inyección de recuerdo al ratón más inmunorreactivo, tras realizarse un test ELISA previo, inyectándose el homogeneizado tisular en solución acuosa sin adyuvante de Freund, por vía intraperitoneal e intravenosa.

El día 88 se realizó la fusión de las células esplénicas del ratón más inmunorreactivo, con células de mieloma NS-1 previamente cultivadas, carentes de la enzima Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferasa (HGPRT⁻).

Fusión

Se siguió el protocolo de fusión parcialmente modificado de Galfre y Milstein (3), fusionándose 5×10^6 células esplénicas con 10^6 células de mieloma con una viabilidad superior al 90%.

El agente fusionante empleado fue polietilenglicol (PEG) 1500 (Aldrich) a una concentración del 50% durante 1 minuto. El medio selectivo de crecimiento de los hibridomas fue un medio con aminopterina, hipoxantina y timidina (medio HAT). Los hibridomas se cultivaron a 37° C y a una concentración de CO₂ del 5%. El cambio del medio de cultivo se efectuó los días 0, 4 y 8 tras la fusión, y posteriormente a esta fecha, se realizó acorde con el cambio de color experimentado por el medio. A partir de la segunda semana, el medio utilizado fue medio HT carente de aminopterina. El clonaje celular se realizó mediante 3 diluciones límite.

Métodos de "screening" de los hibridomas

El inmunoensayo sólido seleccionado por el "screening" de los hibridomas fue el test ELISA. Al homogeneizado tisular se le añadió deoxicolato sódico al 4%, junto con agua destilada en una proporción 1:1:2. La mezcla se agitó durante 30 minutos, se puso en un baño de ultrasonidos el mismo tiempo

y se centrifugó a 10.000 rpm durante otros 30 minutos.

Las placas de polivinilo se cubrieron inicialmente con 100 μ l/pocillo del homogeneizado a una dilución 1/64 (calculada previamente mediante un test ELISA checkerboard), y se incubó toda la noche a 4 °C. La placa se lavó con PBS y se incubó 2 horas a temperatura ambiente en PBS con leche en polvo desnatada al 5%. Tras 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%, se añadieron los sobrenadantes en diluciones seriadas incubándose 2 horas a temperatura ambiente. La placa se incubó posteriormente con 100 μ l/pocillo de un anticuerpo de cabra anti inmunoglobulinas de ratón polivalente conjugado con fosfatasa alcalina (Goat anti-mouse polyvalent immunoglobulins alkaline phosphatase conjugate, Sigma) a una dilución 1/350 durante 2 horas y a temperatura ambiente. Tras lavarla, se añadieron 100 μ l/pocillo del sustrato de ELISA, añadiéndose una tableta de sustrato fosfatasa Sigma 104 (p-nitrofenil fosfato disodio, 5 mg/tableta) por cada 5 ml de sustrato, y se incubó durante 30 minutos. La placa se leyó con un lector ELISA (Titertek Multiskan Plus) con un filtro de 405 nm de longitud de onda.

Los pocillos seleccionados como positivos tras este test se sometieron a técnicas inmunocitoquímicas (PAP y ABC) y de inmunofluorescencia.

Test ELISA para la detección de la clase de inmunoglobulina

Se determinó el isotipo de las inmunoglobulinas de ratón a la que pertenecía el anticuerpo, utilizando el Kit EK-5050 (Mouse monoclonal sub-isotyping Kit EK-5050, Hyclone).

Electroforesis en gel de poli(acrilamida)-dodecil sulfato sódico (SDS-Page)

Se aplicó el protocolo parcialmente modificado de Laemmli (14). El homogeneizado tisular previamente tratado con SDS al 1% se mezcló en proporción 1:1 con el tampón para las muestras (0,5 ml de SDS al 10%, 0,5 ml de Dithiothreitol (DTT) 1 M, 0,1 ml de azul de bromofenol, 0,5 ml de glicerol al 60% y 0,5 ml de tampón del "stracking" (concentración final: Tris-HCl 0,5 M, y SDS 0,4%), hirviéndose 5 minutos. La electroforesis se realizó en un Bio-Rad mini protean II, y el homogeneizado tisular se corrió en un gel de poli(acrilamida) (a una concentración del "resolving" gel del 12% y a una concentración del

"stracking" gel del 5% con gradiente) a intensidad constante y a un voltaje de 60 V durante 90 minutos.

Western Blotting

Se aplicó el protocolo parcialmente modificado de Towbin y cols. (21). La transferencia a los filtros de nitrocelulosa se realizó a voltaje constante, con una intensidad de 200 mA, y aproximadamente en 1 hora en un aparato de transferencia (2005 Transphor Electrophoresis Transfer Unit, LKB), utilizando un tampón de transferencia (concentración final: Tris 25 mM, glicina 192 mM, y metanol 20%).

Los filtros se extrajeron, se lavaron con PBS en agitación y se incubaron toda la noche a 4 °C con PBS con leche en polvo desnatada al 5%. Se añadió el anticuerpo monoclonal a una dilución 1/100 en PBS con leche en polvo desnatada al 1%, y se mantuvo 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

Marcaje con agentes enzimáticos

Tras el lavado se añadió un anticuerpo de conejo anti ratón (Sigma) a una dilución 1/200 en PBS con leche en polvo desnatada al 1% incubándose 2 horas en agitación, y a temperatura ambiente. En el siguiente paso, se incubaron con un anticuerpo de cabra anti conejo conjugado con peroxidasa (Sigma) a una dilución 1/500 en PBS con leche en polvo desnatada al 1% durante 2 horas en agitación, y a temperatura ambiente. La peroxidasa se reveló con diaminobenzidina tetrahidroclorada (Sigma) y peróxido de hidrógeno al 30%.

Marcaje con yodo radioactivo

Tras añadir el anticuerpo monoclonal, los filtros se lavaron y se incubaron con fragmentos F (AB') 2 de oveja anti inmunoglobulinas de ratón marcados con 125 I (Sheep anti mouse Ig 125 I labelled F (AB') 2 fragment, Amersham), a una dilución 1/2.000 en PBS con leche en polvo desnatada al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente, y en agitación. Los filtros se secaron, se introdujeron junto con una película en una cassette a -80° C durante 48 horas, y la película se reveló.

Precipitación con sulfato amónico

El sobrenadante extraído del cultivo de los hibridomas se centrifugó a 2.000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos. Se desechó el pellet, se añadió la mitad del sulfato amónico requerido para alcanzar una concentración final de saturación del mismo del 50% (a 1

litro de la solución problema, sería necesario añadirle 313 g de sulfato amónico), y se dejó en agitación 6 horas a 4 °C. La solución resultante se centrifugó a 2.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, se desechó el pellet, y se añadió la otra mitad de sulfato amónico, dejándolo en agitación otras 6 horas a 4 °C.

La solución resultante se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en un volumen de PBS aproximadamente entre un 5 a un 10% del volumen inicial de sobrenadante. La solución se transfirió a una membrana de diálisis toda la noche a 4 °C.

Filtración en gel

Un gel de agarosa (Pharmacia Sepharosa 4B) se transfirió al interior de una columna (Pharmacia) con una capacidad para aproximadamente 20 veces el volumen total de anticuerpo. Este se extrajo de la membrana y se filtró a través de la columna. Se calculó la concentración de proteína existente (mg/ml) en las fracciones recogidas, por el método de Layne (16) y por el de Lowry (17).

Preparación del tejido nervioso

Los sobrenadantes positivos al test ELISA, y posteriormente el anticuerpo monoclonal purificado, fueron probados en cortes congelados de tejido nervioso humano, de mono y de rata, y en cortes incluidos en parafina (tejido humano y de rata).

El tejido nervioso humano fue fijado mediante una perfusión intravascular (vía arteria carótida interna) con una solución de paraformaldehído al 4%, con ácido pícrico al 0,02%, diluida en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 durante 2-3 horas. El cerebro se postfijó durante 24-48 horas con una solución de paraformaldehído al 4% recién preparada. Después con una solución de glicerol al 10% en tampón fosfato 0,1 M con DMSO al 2% durante 3 días, y finalmente en una solución de glicerol al 20% en el mismo tampón con DMSO al 2% durante 5 días. Los bloques se congelaron y se almacenaron a -80 °C cortándose con un micrótopo de congelación (Reichert-Jung Histoslide 2000) a 30 y 50 µm de espesor.

El tejido nervioso de mono fue fijado mediante una perfusión por vía transcardíaca con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4, y se introdujo en una solución de sacarosa al 30% en el mismo tampón. Los cortes se efectuaron a 50 µm de espesor.

Parte del tejido nervioso de rata fue fijado con la

misma solución de fijación que en el caso del tejido nervioso de mono. El tejido nervioso de otras ratas fue perfundido por vía transcardíaca con paraformaldehído al 1% con glutaraldehído al 1,25%. Posteriormente se perfundió con estas mismas soluciones a las que se les añadió sacarosa al 10%, a 4 °C. Tras ello, y también en hielo picado, se perfundió con una solución de sacarosa al 10% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4. El cerebro se introdujo en una solución de sacarosa al 30% en el mismo tampón, los bloques se congelaron y se cortaron a 30 µm de espesor.

Los cortes de rata previamente fijados en formol tamponado al 10% e incluidos posteriormente en parafina, y aquellos fijados en paraformaldehído al 4% e incluidos también en parafina fueron cortados con un micrótopo de parafina (Reichert-Jung Parafina 2030) a 7 µm de espesor.

Técnicas inmunocitoquímicas

Se aplicaron dos técnicas inmunocitoquímicas: la técnica de los complejos peroxidasa anti-peroxidasa (PAP), y la técnica de los complejos avidina-biotina (ABC).

En la técnica del PAP se aplicó el protocolo parcialmente modificado de Sternberger y cols. (20). Los cortes se trataron con H₂O₂ al 1% durante 30 minutos, en agitación y a temperatura ambiente, y se incubaron, tras su lavado con PBS, con suero normal de cabra (Zymed) al 5% en PBS con Triton X-100 (Panreac) al 0,3% durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

Los cortes se incubaron con los sobrenadantes de los hibridomas en cultivo, o con el anticuerpo monoclonal, a 4 °C, en agitación durante 24 horas, a una dilución 1/50-1/100 en PBS con Triton X-100 al 4%. Tras su lavado se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, con un anticuerpo de cabra anti inmunoglobulinas de ratón polivalente conjugado con peroxidasa (Goat anti-mouse polyvalent immunoglobulins peroxidase conjugate, Sigma) a una dilución 1/350 en PBS con Triton X-100 al 4%. Los cortes se incubaron con una solución de 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocliclorada (DAB, Sigma), a una concentración del 0,05% con H₂O₂ al 0,033% durante 15 minutos.

En la técnica del ABC se aplicó el protocolo parcialmente modificado de Hsu y cols. (10). En este caso, los cortes se incubaron con el anticuerpo monoclonal a una dilución 1/100 durante 48 horas a 4 °C y en agitación. Después, con un anticuerpo de cabra

anti IgM (específico de la cadena μ) de ratón conjugado con biotina (Goat anti-mouse IgM (μ -chain specific) biotin conjugate, Sigma) a diluciones entre 1/5.000-1/20.000 en PBS más Triton X-100 diluido al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

Tras el lavado, se incubaron con los complejos avidina-biotina (ABC Complex-HRP (Dakopatts) y Vectastain ABC Kit (Vector)) a una dilución 1/100 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. El revelado se realizó en las mismas condiciones y con los mismos reactivos que para la técnica del PAP.

Los cortes obtenidos se intensificaron en ambas técnicas con osmoticarbohidrazida. Se empleó tetróxido de osmio (Sigma) al 0,005% y tiocarbohidrazida (THC, Electron Microscopy Science) al 0,05%.

Técnica de inmunofluorescencia

En esta técnica se aplicó el protocolo parcialmente modificado de Higgins y cols. (9). Los cortes se incubaron con un anticuerpo de cabra anti inmunoglobulinas de ratón polivalente conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FTIC) (Goat anti-mouse polyvalent immunoglobulins FTIC conjugate, Sigma) a una dilución 1/100 en PBS con Triton X-100 al 4%, en agitación, a temperatura ambiente, y durante 1 hora.

Resultados

Fusión

El rendimiento inicial de la fusión fue aproximadamente del 28% (40 pocillos con hibridomas, de un total de 144 pocillos).

Los 40 pocillos iniciales con hibridomas se sometieron a un inmunoensayo en fase sólida. Se realizaron 4 test ELISA, con un intervalo de tiempo aproximado entre ellos de 4 a 7 días. Tras este primer "screening", se seleccionaron 5 pocillos con hibridomas positivos a este test. El criterio de valoración de la positividad a este test se basó en la existencia de al menos dos test ELISA positivos, con unos valores $>0,500$ después de restar el valor del control negativo.

Tras su "screening" mediante el empleo de las técnicas inmunocitoquímicas y de inmunofluorescencia, solamente el sobrenadante de uno de los 5 pocillos identificados inicialmente como positivos, marcó específicamente una determinada población celular en todos los cortes del tejido nervioso humano, de mono, y de rata preparados a tal efecto.

Caracterización del anticuerpo monoclonal

El resultado del test ELISA para la determinación de la clase y subunidad de inmunoglobulina a la que pertenece el anticuerpo, que se hizo empleando el Kit EK-5050 de Hyclone, concluyó que el anticuerpo monoclonal (GMA) es de la clase IgM.

Tras una electroforesis en gel de poliacrilamida, usando SDS al 10% como agente desnaturante (SDS-Page), las proteínas se transfirieron del gel a un filtro de nitrocelulosa, mediante un Western Blott. El marcaje posterior de los filtros de nitrocelulosa con yodo radiactivo (^{125}I), reveló la existencia de 3 bandas muy próximas entre sí. El anticuerpo monoclonal (GMA) sin purificar, reconoce 3 polipéptidos cuyos pesos moleculares aproximados son de 38, 40 y 43 KD. Una vez que el anticuerpo monoclonal se purificó, el marcaje de los filtros con ^{125}I , y con peroxidasa-DAB reveló la existencia de una única banda principal, con un peso molecular aproximado de 43 KD.

Concentración óptima de trabajo del anticuerpo monoclonal

Las diluciones del sobrenadante de los hibridomas en cultivo empleadas en las técnicas del PAP y del ABC, abarcaron diluciones comprendidas entre 1/50 y 1/32.000, estando su rango óptimo de actuación en las diluciones 1/50-1/100.

La concentración del anticuerpo monoclonal una vez purificado, determinada por el método de Layne y por el método de Lowry, fue de 2,5 mg/ml. El rango óptimo de trabajo del anticuerpo monoclonal purificado se obtuvo en diluciones comprendidas entre 1/50-1/500, siendo las diluciones 1/50 y 1/100 las que producían un marcaje más uniforme en todas las series de cortes de tejido nervioso examinadas.

Marcaje del GMA en cortes de tejido nervioso congelado

En el caso de tejido nervioso humano y de mono, el protocolo de fijación con paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0,02%, es suficiente para preservar el antígeno de manera que el GMA lo marca de un modo específico. El anticuerpo monoclonal obtenido tras la inmunización con el homogeneizado tisular de hipocampo humano, marca de forma específica las células gliales, y dentro de esta clase, los astrocitos. En ningún caso hemos observado la presencia de neuronas marcadas en las preparaciones estudiadas. El anticuerpo monoclonal produce un marcaje espe-

Figura 1 (A)

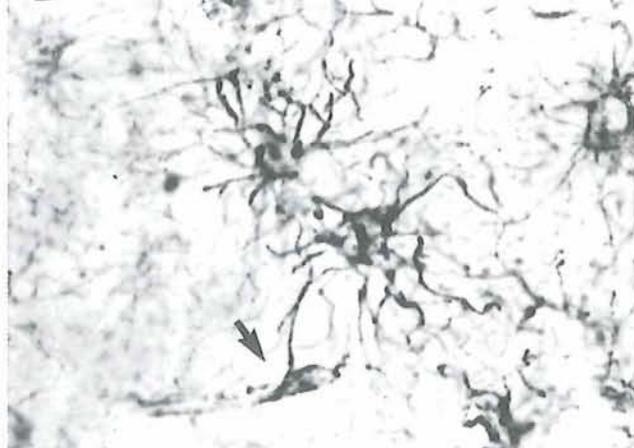
A



Astrocyto protoplasmático del estrato radial del sector CA1 de hipocampo humano (x250).

Figura 1 (B)

B



Astrocytos protoplasmáticos del estrato lacunoso-molecular del sector CA1 de hipocampo humano. La flecha indica la localización de un pie chupador en contacto con la pared de un capilar (x500).

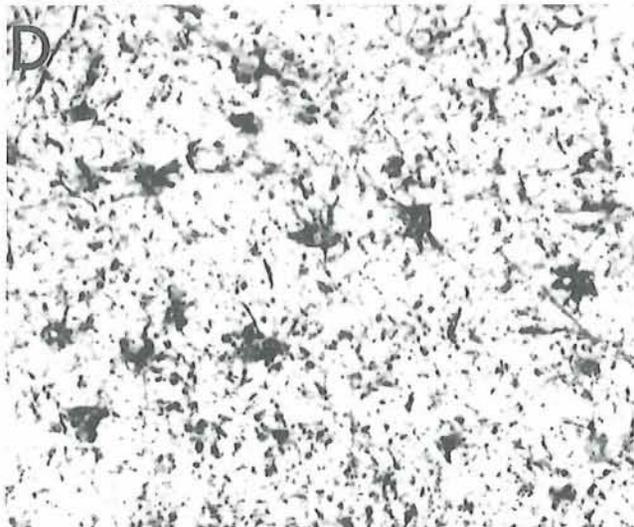
Figura 1 (C)

C



Astrocytos de los estratos oriens y piramidal del sector CA1 de hipocampo humano (x125).

Figura 1 (D)



Detalle de los astrocytos del estrato oriens de la figura anterior (x250).

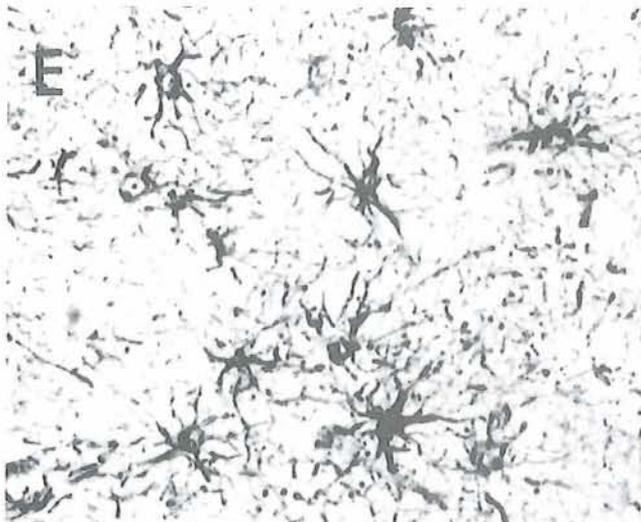
cífico, tanto de los astrocytos fibrosos como de los protoplasmáticos, sin que exista ninguna especificidad regional, es decir, presenta una distribución uniforme en los cortes de tejido nervioso analizados.

Los astrocytos protoplasmáticos han sido descritos clásicamente en la sustancia gris del sistema nervioso central. La inmunoreacción a nivel de célula individual produce un marcaje específico de todo el astro-

cito, pudiéndose observar un soma celular pequeño, de contorno oval o triangular. Del soma surgen una serie de prolongaciones que se ramifican profusamente, confiriendo a la célula un aspecto estrellado.

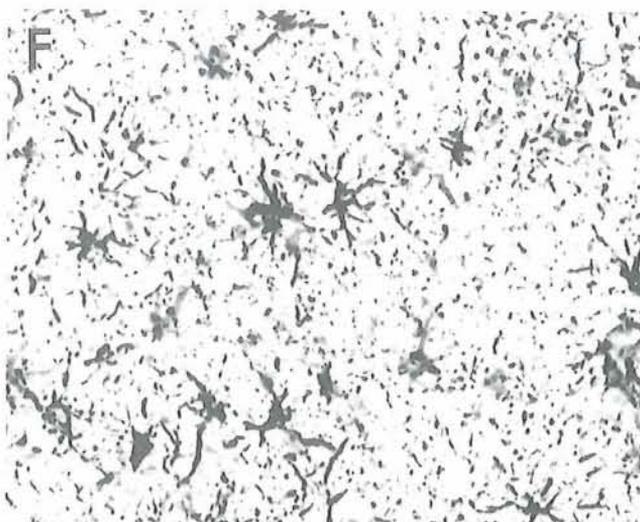
El citoplasma de los astrocytos apareció discretamente marcado (fig. 1A, 1B y 1E). La inmunoreacción parece estar distribuida por el citoplasma. Este aparece con unas condensaciones en su parte exterior,

Figura 1 (E)



Astrocito protoplasmático de corteza temporal humana (x250).

Figura 1 (F)



Astrocitos protoplasmáticos de la capa VI de corteza cerebral humana (x250).

en ocasiones de aspecto filamentososo. Cuando el plano de sección del astrocito pasa a nivel del núcleo, queda un espacio vacío correspondiente al núcleo que no muestra inmunoreactividad alguna. En otras ocasiones se mostraron formas astrocitarias más robustas y gruesas (fig. 1C, 1D y 1F), irradiando en todas las direcciones a partir del soma celular.

Se observan expansiones citoplasmáticas que se ramifican, produciendo proyecciones que alcanzan la superficie de la piamadre. Los astrocitos situados cerca de la superficie del cerebro, o a nivel de la médula espinal, poseen prolongaciones que se extienden hasta la superficie de la piamadre. La mayor concentración de prolongaciones astrocitarias se halla debajo de la superficie de la piamadre, en donde las proyecciones de un gran número de extensiones de los pies terminales de los astrocitos forman la glía limitante (fig. 2B). Es a este nivel donde el GMA produce un marcaje astrocitario muy intenso, lo que confiere al fondo un aspecto punteado, o en ocasiones, reticulado.

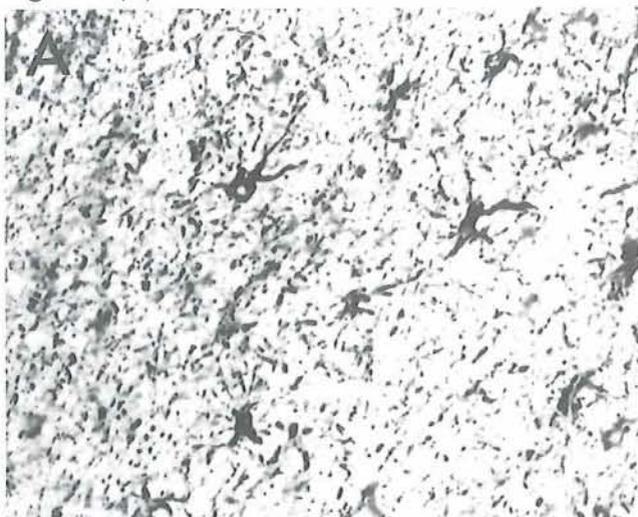
Tal y como corresponde a la descripción clásica de los astrocitos, una característica típica es la presencia de pies chupadores en los capilares del sistema nervioso central (fig. 1B). La inmunoreactividad detectada en los astrocitos alcanza los pies chupadores de los astrocitos. En otras ocasiones los capilares aparecen también con una gran cantidad de pies chupadores que en algunos casos se pueden seguir hasta las células de origen.

A nivel de la sustancia blanca, es característica la existencia de astrocitos fibrosos (fig. 2A). La inmunoreacción obtenida presenta características en todo punto similares al marcaje de los astrocitos protoplasmáticos. La población celular es idéntica a la que se observa en la sustancia gris, puesto que marca tanto el soma como las prolongaciones que nacen de él. En este caso, se observan prolongaciones gruesas y que aparecen en el plano de sección por una distancia corta. El fondo está constituido por una considerable cantidad de prolongaciones gliales, a diferencia del observado en la sustancia gris.

En el tejido nervioso de rata la perfusión con paraformaldehído al 4% dio lugar a un marcaje astrocitario escaso, fragmentario y difícil de reconocer, especialmente en aquellas zonas con una permeabilidad especial (eminencia media, zona supraquiasmática, órgano subfornical, etc.). Tan sólo la glía subpial y la glía de Bergmann en el cerebelo (fig. 2D) se marcaron con claridad. La perfusión con paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1,25% cambió significativamente el resultado de la inmunoreacción, ya que, además de los sitios reseñados anteriormente, se observó un marcaje astrocitario a todos los niveles del SNC (fig. 2C).

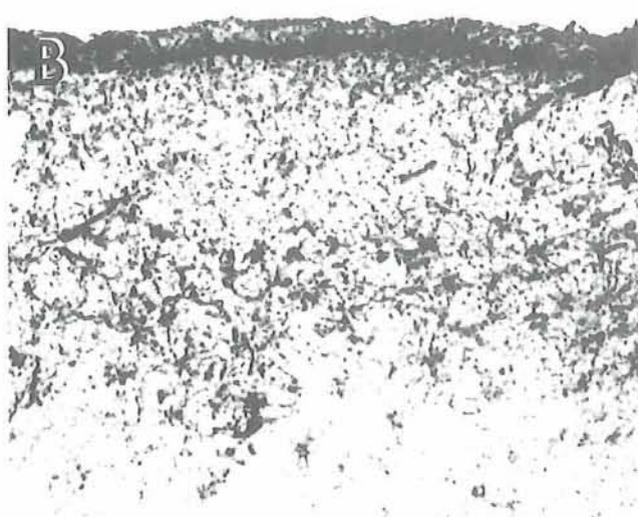
El aspecto de los astrocitos en las tres especies examinadas es básicamente similar, indicando la existencia de epítipes comunes para las tres especies. Dejando aparte las pequeñas diferencias morfológicas existentes entre las distintas especies, el anticuer-

Figura 2 (A)



Astrocitos fibrosos de la sustancia blanca de corteza cerebral humana (x250).

Figura 2 (B)



Astrocitos y glia limitante en parasubiculo humano (x125).

Figura 2 (C)

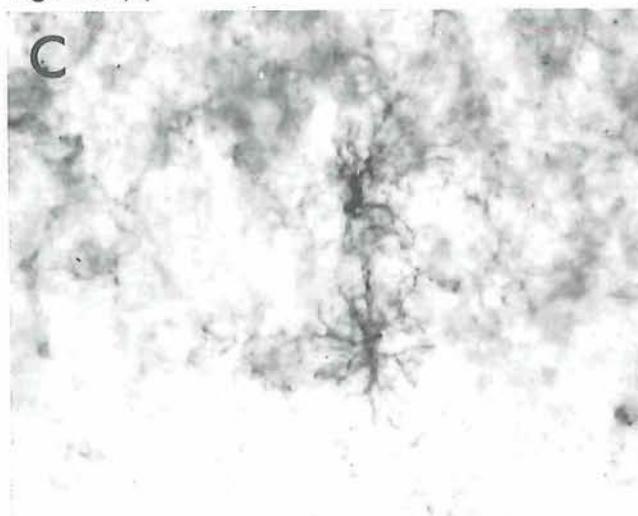


Figura 2. C. Astrocitos protoplasmáticos de la formación reticular troncoencefálica de rata (x250).

Figura 2 (D)

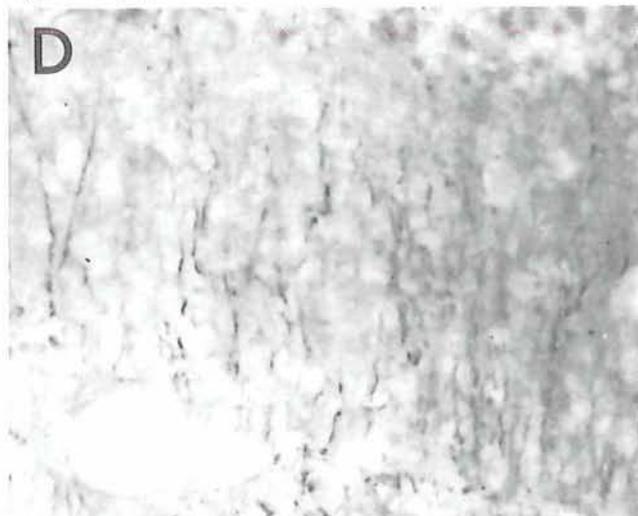


Figura 2. D. Glía de Bergmann de cerebelo de rata (x250).

po monoclonal marca de forma específica la misma población celular, y con el mismo detalle estructural (por ejemplo en todas las especies se observa claramente la existencia de pies chupadores y prolongaciones astrocitarias finas).

Marcaje del GMA en cortes de tejido incluidos en parafina

Las pruebas primeras realizadas en tejido fijado en

formol al 10% tamponado dieron consistentemente un resultado negativo. Por esta razón empleamos un fragmento de corteza parietal de un cerebro perfundido por vía intracarotídea con paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0,02%. El fragmento de corteza fue incluido en parafina y se obtuvieron cortes a 7 μ m de espesor. El resultado fue parecido al obtenido en cortes de congelación, en cuanto al aspecto de los astrocitos. Estos presentaban la misma intensidad de

marcaje, sólo que la longitud de las prolongaciones era menor que en los cortes de congelación (seguramente por el grosor de los cortes). El citoplasma aparecía marcado en más ocasiones que en el caso de los cortes de congelación. Este fenómeno lo interpretamos como debido al plano de sección, ya que se daba también, aunque con una frecuencia menor, la presencia de astrocitos con una zona central clara por la presencia del núcleo.

Discusión

El anticuerpo monoclonal (GMA) se ha revelado como un marcador específico de los astrocitos, tanto fibrosos como protoplasmáticos. Mientras que la mayoría de los anticuerpos monoclonales descritos frente a antígenos neurales se han obtenido inicialmente en otras especies, y posteriormente se ha comprobado su posible aplicación en cortes de tejido nervioso humano, la importancia del desarrollo de este anticuerpo monoclonal radica en el hecho de que se ha obtenido tras inmunizar a ratones BALB/C con un homogeneizado tisular, procedente del sector CA1 de un hipocampo humano, y que una vez comprobada su aplicación y utilidad en cortes de tejido nervioso humano, se ha probado en otras especies. Por lo tanto, nuestro objetivo perseguía, específicamente, un marcador celular humano.

Al analizar los resultados obtenidos tras la aplicación de las técnicas inmunocitoquímicas en los cortes de tejido nervioso de las tres especies, destaca el hecho de la diferente antigenicidad mostrada por el GMA en relación a los distintos fijadores empleados en las tres especies estudiadas.

Los fijadores utilizados, así como los métodos de fijación de los cortes de tejido, tienen una especial importancia en el grado de preservación de la antigenicidad de los tejidos así como en el posterior comportamiento de los anticuerpos frente a ellos (15, 18).

La fijación empleada en los cortes de tejido nervioso humano (paraformaldehído al 4% con ácido pícrico al 0,02%), preserva la antigenicidad del tejido para nuestro anticuerpo, de tal forma que el marcaje producido por el GMA es uniforme a lo largo de todo el tejido observado. El GMA reacciona con una proteína glial humana de 43 KD de peso molecular.

Creemos que dicha proteína comparte epítopes comunes con otras proteínas gliales similares de otras especies. Existe una similitud entre las proteínas gliales de distintas especies, como lo demuestra

el hecho de que el GMA marca de forma más o menos uniforme cortes de tejido de rata y mono.

En el caso de otras especies, el paraformaldehído puede no ser suficiente para evitar la degradación de la proteína, y enmascarar los epítopes comunes que la proteína glial de rata y mono presenta con la proteína glial humana, y de esta forma se puede perder la antigenicidad.

En los cortes de tejido nervioso de mono y de rata, el empleo de paraformaldehído al 4%, como único fijador, no preserva el antígeno reconocido por el GMA. La antigenicidad con este fijador sólo está preservada en la glía subpial, y en un tipo especial de glía, la glía de Bergmann del cerebelo, produciendo un marcaje nulo en el resto de tejido nervioso.

La combinación como fijadores de paraformaldehído al 1% con glutaraldehído al 1,25% no sólo preserva la antigenicidad a nivel de la glía de Bergmann, sino que preserva la antigenicidad del resto del tejido. Por lo tanto, no distorsiona o enmascara los epítopes gliales, y sí previene su degradación o lisis, de tal modo que es reconocido por el GMA.

Este hecho sugiere que existen diferencias interespecie en lo que respecta a la labilidad del antígeno, del tal modo que, o bien el tejido humano expresa los epítopes en una mayor proporción que en el caso de la rata, con lo cual una fijación con paraformaldehído es suficiente, o bien, aunque hay una afinidad entre el antígeno de los astrocitos del hombre y de la rata en lo que a reconocimiento por el GMA se refiere, diferencias estructurales entre uno y otro hacen necesaria la presencia de glutaraldehído para preservar la antigenicidad en el caso de la rata, pero no en el caso del hombre. Parece claro que el antígeno presenta una labilidad bastante notable; labilidad que es parcialmente neutralizada cuando se emplean métodos de fijación distintos.

GMA se probó en cortes de tejido incluidos en bloques de parafina, que previamente habían sido fijados en formol al 10%. En todas las series probadas, el anticuerpo no ha producido un marcaje claro. Este hecho parece indicar que la fijación con formol, usualmente suficiente en la buena parte de la inmunocitoquímica de rutina, no es suficiente en este caso, sugiriendo una labilidad proteica mayor que el resto de proteínas del SN. GMA se probó también en cortes de tejido previamente fijado con paraformaldehído al 4%, y posteriormente incluido en parafina, produciendo un marcaje similar al observado en los cor-

tes de tejido congelado previamente perfundido. De ello deducimos que la pérdida de la antigenicidad tisular está en relación con la fijación empleada, no siendo imputable a la propia inclusión en parafina.

El anticuerpo monoclonal GMA no es específico de ningún área concreta del SNC, por cuanto marca la misma población glial en todos los sistemas neurales comprobados, a la par que tampoco es especie específica, por cuanto también marca otras especies.

Los resultados de las pruebas realizadas con el GMA en cortes de tejido nervioso de distinto grosor, han revelado que el anticuerpo presenta una baja penetración en el tejido. Esta penetración se ve incrementada por el empleo de detergentes. El empleo como detergente del Tritón X-100, ha favorecido el grado de penetración del GMA en el tejido, apareciendo en un marcaje astrocitario uniforme con un grosor tisular de 30 μm , frente al marcaje cuantitativa y cualitativamente inferior obtenido en los cortes de 50 μm .

Comparando los resultados obtenidos con las técnicas de inmunofluorescencia y con las técnicas inmunocitoquímicas, es de destacar la mayor sensibilidad de estas últimas. La inmunofluorescencia se ha revelado parcialmente ineficaz en su aplicación a los cortes de tejido nervioso humano, por cuanto la propia lipofuscina del tejido nervioso humano enmascara la reacción de fluorescencia producida por el FTIC. Aplicada en cortes de tejido nervioso de rata, ha revelado un marcaje astrocitario, pero, en todo caso, mucho menos uniforme que mediante el empleo de las técnicas inmunocitoquímicas. El ABC se ha revelado como la mejor técnica inmunocitoquímica, por cuanto permite un marcaje astrocitario uniforme y constante a lo largo de todas las series observadas, a la par que permite trabajar con rangos de dilución del GMA mayores que los empleados en el PAP.

Aplicaciones

El anticuerpo que hemos obtenido puede ser utilizado en una variedad de estudios que abarcan desde aspectos del desarrollo hasta las alteraciones del sistema nervioso central propias de la neuropatología. En efecto, el sistema nervioso central, desde un enfoque neurocientífico completo, no puede pasar por alto los elementos no neuronales también presentes, y que en muchos casos son tan determinantes como las neuronas en la fenomenología de los procesos patológicos del sistema nervioso.

El GMA puede tener utilidad y ofrecer una exposición de la población astrocitaria en:

A) Infecciones virales del sistema nervioso, incrementando el conocimiento del comportamiento de los astrocitos ante estas situaciones.

B) Situaciones de hipoxia, en la que se describen cambios en la glía astrocitaria.

C) Alteraciones metabólicas, en donde la glía no sólo parece tener un papel fundamental en la regulación del medio en donde las neuronas efectúan su comunicación sináptica, sino que también juega un importante papel en la protección contra alteraciones producidas por sustancias excitotóxicas.

D) Enfermedades neurodegenerativas, destacando entre ellas el papel que la glía astrocitaria tiene en la enfermedad de Alzheimer.

E) Estudio del desarrollo normal y patológico en el sistema nervioso central.

F) Traumatismos y lesiones neurológicas de los nervios periféricos y médula espinal. Quizá el anticuerpo caracterizado en el presente estudio pueda contribuir a un conocimiento más detallado de la neurobiología integral de fenómenos que puedan tener su aplicación en la mejora del diagnóstico y/o tratamiento de afecciones neurológicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Campbell, A.M. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Monoclonal antibody technology. Elsevier, Amsterdam, 1986.
2. De ST. Groth, F., and Scheidegger, D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* 35: 1-21, 1980.
3. Galfre, G., and Milstein, C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzimol.*, 73: 3-46, 1981.
4. Galfre, G., Milstein, C., and Wright, B. Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fc portion of mouse IgG. *Nature* 277: 131-133, 1979.
5. Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W., and Howard, J.C. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266: 550-552, 1977.
6. Goding, J.W. Antibody production by hybridomas: review article. *J. Immunol. Methods* 39: 285-292, 1980.
7. Goding, J. W. Monoclonal antibodies: principles and practice. Academic Press, London, 1983.
8. Harlow, E., and Lane, D. Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
9. Higgins, T.J., O'Neill, H.C., and Parish, C.R. A sensitive and quantitative fluorescence assay for cell surface antigens. *J. Immunol. Methods* 47: 275-287, 1981.
10. Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger, H.

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 577-580, 1981.

11. Kohler, G., and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975.

12. Kohler, G., and Milstein, C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumour lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.*, 6: 511-519, 1976.

13. Kohler, G., Howe, S.C., and Milstein, C. Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.*, 6: 292-295, 1976.

14. Laemmli, E.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

15. Larson, L.I. Immunocytochemistry: theory and practice. CRC Press, Inc, Florida, 1988.

16. Layne, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.*, 3: 447-454, 1957.

17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A., and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.

18. Polak, J.M., and Van Noorden, S. Immunocytochemistry: practical applications in pathology and biology. John Wright and Sons, Bristol, England, 1983.

19. Springer, T.A. Hybridoma technology in the biosciences and medicine. Plenum Press, New York, 1985.

20. Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Jr., Cuculis, J.J., and Meyer, H.G. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18: 315-333, 1970.

21. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 4350-4354, 1984.

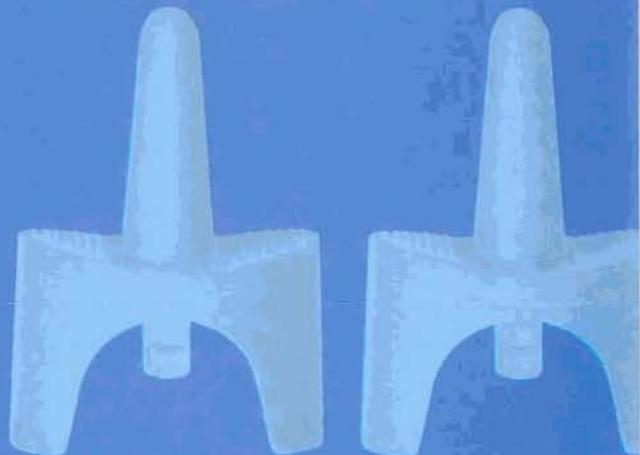
22. Zola, H. Monoclonal antibodies: a manual of techniques. CRC Press, Inc, Florida, 1987.

Calsynar

Calcitonina sintética de salmón

intranasa

CALSYNAR INTRANASAL. COMPOSICION: Cada nebulización con Calcitonina (DCI) sintética de salmón: 100 UI. Excipientes c.s.p.: 70 mcl.
DADES: La calcitonina es un importante factor regulador del metabolismo óseo, al actuar tanto sobre el hueso como sobre la homeostasis de la estructura de la calcitonina está constituida por 32 aminoácidos en una sencilla, cuya secuencia difiere según las especies. **INDICACIONES:** Enfermedad de Paget. Osteoporosis postmenopáusica. **POSOLOGIA:** La posología la indica el médico, tanto la dosis diaria como la duración del tratamiento. Enfermedad de Paget: Comenzar el tratamiento con 200 UI diarias, repartidas en dos administraciones, una por la mañana y otra por la noche. Se recomienda cada una de las dos administraciones diarias en fosas nasales diferentes para controlar el tratamiento con la medida de la actividad sérica de fosfatasa alcalina (alternativamente por medida de la hidroxiprolina eliminada en la orina en 24 horas). La posible mejora de la sintomatología neurológica requiere tratamientos mínimos de un año para hacerse evidente. En los casos donde es predominante la sintomatología neurológica y/o deformación



debe considerarse la conveniencia de continuar la pauta posológica de 100 UI/día aun después de haberse obtenido la estabilización de los parámetros bioquímicos. Osteoporosis postmenopáusica: La dosis puede establecerse en 200 UI diarias, junto con calcio (equivalente a 600 mg de calcio elemental y vitamina D (400 UI/día). Es imprescindible una dieta adecuada. Se recomienda la administración única diaria por la noche y, en alternancia, cada una de las fosas nasales. **ADVERTENCIAS:** Si no se aprecia mejoría de los parámetros bioquímicos en las dos primeras semanas tras el comienzo del tratamiento, éste debe suspenderse y, si se estima procedente, instaurar una alternativa. Los pacientes sometidos a terapia a largo plazo pueden desarrollar anticuerpos a las calcitoninas. Sin embargo, la eficacia clínica no se ve afectada en general. Los fenómenos de escape observados en algunas ocasiones de tratamiento a largo plazo se deben probablemente a una saturación de los receptores de unión y aparentemente no están relacionados con el desarrollo de anticuerpos. **CONTRAINDICACIONES:** Hipersensibilidad a la calcitonina. El empleo de calcitonina en mujeres embarazadas debe reservarse a los casos en que, por criterio médico, el beneficio supera a obtenerse los posibles riesgos. No debe administrarse a niños. No se recomienda la lactancia materna durante el tratamiento: existe evidencia de que la calcitonina pasa a la leche materna. **CAUCIONES:** Es conveniente efectuar una evaluación periódica de la función renal durante el tratamiento. En caso de rinitis crónica o antecedentes de intervención quirúrgica de las fosas nasales, la terapia debe aplicarse con vigilancia médica, con el fin de comprobar que la absorción del fármaco no se modifica. **EFFECTOS SECUNDARIOS:** Pueden presentarse náuseas, más raramente vómitos o ligero rubor facial acompañado de sensación de calor. Estos efectos son dosis-dependientes. La calcitonina puede provocar reacciones de hipotensión. Se han descrito reacciones aisladas de tipo anafiláctico que han requerido taquicardia, hipotensión y colapso. **INTOXICACION Y TRATAMIENTO:** Las dosis más elevadas que las recomendadas provocarían trastornos de tipo sistémico (náuseas, vómitos) con sensación de calor en el rostro, acompañado de sintomatología hipocalcémica. El tratamiento consiste en suprimir inmediatamente el preparado y aplicar medidas sintomáticas. **NORMAS PARA UNA CORRECTA ADMINISTRACION:** 1. Extraer el vial del envase (blíster). 2. Quitar la cubierta protectora del nebulizador. 3. Introducir el nebulizador en la nariz apoyando los dedos índice y medio sobre los dos lados de la base del cono nebulizador y presionar el pulgar debajo del cilindro pequeño de vidrio. Apretar con fuerza produciendo un movimiento rápido. El vial monodosis sólo puede ser utilizado una vez. Con cada nebulización se administran 100 UI. **CONDICIONES DE CONSERVACION:** Antes de su uso Calsynar Intranasal debe mantenerse en refrigeración. Cuando se esté utilizando, puede conservarse a temperatura ambiente (por debajo de 22°C) hasta un máximo de 4 semanas. **PRESENTACION:** Envase con dos nebulizadores monodosis, conteniendo 70 mcl cada uno de solución estéril, lo que corresponde a una dosis de 100 UI por cada vial. P.V.P.: 5.635,- ptas. **Con receta médica. APORTACION MINIMA PARA LOS EFECTOS DE LA SEGURIDAD SOCIAL (50 Ptas.).**