

ARTICULOS ORIGINALES

Inmunodetección por peroxidasa de células de ganglio sensorial infectadas por virus de rabia

Jaime E. Castellanos¹, David R. Castañeda², Hernán Hurtado², Alvaro E. Velandia¹

Resumen

Con el objetivo de establecer una técnica de inmunocitoquímica por avidina-peroxidasa biotinilada para la detección de células infectadas *in vitro* por el virus rábico, se usaron cultivos de ganglio de la raíz dorsal de ratón. En este trabajo se presentan los resultados del proceso de estandarización de la inmunoperoxidasa, en la que también se usa el conjugado antirrábico producido en el Instituto Nacional de Salud. Las diluciones de anticuerpo, que normalmente se usan en la inmunofluorescencia, muestran un excesivo ruido de fondo en la inmunoperoxidasa. Se discuten las posibles razones de este artefacto y se presenta un protocolo para la detección por inmunoperoxidasa de células de ganglio sensorial infectadas *in vitro* por virus de rabia.

Summary

An immunoperoxidase ABC technique was developed to detect rabies virus in dorsal root ganglion cells. This paper presents the standardization of the immunoperoxidase ABC technique which uses the antirabies conjugate produced by the Colombian Instituto Nacional de Salud. Antibody dilution normally used in the fluorescence routine technique shows an excessive background in the ABC assay. We discuss the possible reasons and present a protocol that minimizes the high background in the ABC immunoassay.

El sistema de inmunodetección que utiliza un anticuerpo y una enzima biotinilados unidos por medio de una molécula de avidina, fue desarrollado en la década de los 80 por Hsu (1, 2) y, desde entonces, ha demostrado ser una metodología fácil, reproducible y económica para la inmunocitoquímica. El sistema implica una fuerte amplificación de la señal del antígeno buscado por el uso de los anticuerpos primario y secundario y por la incubación con el complejo enzima-avidina (3-5), de tal manera que, cantidades de antígeno indetectables por otros medios, se hacen evidentes.

La inmunodetección de las células infectadas *in vitro* por el virus rábico se hace, generalmente,

por inmunofluorescencia directa, usando un anticuerpo primario acoplado a isotiocianato de fluoresceína (6-8). Con esta técnica se obtienen resultados reproducibles, aunque adolece de varios problemas, como el ser una preparación cuya vida útil es muy corta, utilizar una concentración elevada de anticuerpo primario y requerir de un microscopio de fluorescencia, costoso y no siempre disponible.

El Laboratorio de Neurobiología del Instituto Nacional de Salud está trabajando en un modelo *in vitro* para estudiar la interacción entre el virus rábico y las células del sistema nervioso. Con el fin de obviar las limitantes señaladas en el trabajo con fluorescencia, se presentó la

¹ Subdirección Industrial, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, Colombia.

² Laboratorio de Neurobiología, Subdirección de Investigaciones, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, Colombia.

necesidad de poner a punto la técnica de detección *in vitro* del virus rábico, utilizando un anticuerpo secundario biotinilado y un complejo avidina-peroxidasa biotinilada (ABC). Este informe describe dicha técnica.

Materiales y métodos

Virus

Todos los procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Vacuna Antirrábica de la Subdirección Industrial del Instituto Nacional de Salud, por personal vacunado y bajo las condiciones de bioseguridad requeridas.

El virus (cepa CVS-BHK) se produjo en células BHK, titulado *in vivo*, por inoculación intracerebral de diluciones seriadas del virus en ratones de 14 a 16 g. En los experimentos se usó un *stock* de virus con un título de $10^{1,5}$ DL_{50} .

Cultivos celulares

Para cada cultivo se sacrificaron dos ratones adultos y, en condiciones de esterilidad, se obtuvieron en total 60-70 ganglios de la raíz dorsal. Estos se disociaron enzimáticamente durante 90 min con colagenasa 1 mg/mL en DMEM más 10% de suero fetal bovino (SFB). Con el fin de completar la disociación, adicionalmente se realizó una disociación mecánica, pasando la suspensión celular a través de una pipeta Pasteur adelgazada.

Se valoró la viabilidad de la suspensión celular obtenida, utilizando el método de exclusión del azul tripano. El número total de células se determinó en un hemocitómetro. Se sembraron 2.000 neuronas viables/pozo sobre cubreobjetos redondos de vidrio, que previamente se habían cubierto con poli-L-lisina (10 μ g/mL) y se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos. El medio de cultivo inicial fue 500 μ L/pozo de DMEM con SFB al 10%. A las 48 horas, se cambió el medio a DMEM con 10% de SFB y citosina arabinósido 10^{-5} M con el fin de evitar la proliferación excesiva de las células neuronales. Un segundo cambio de medio se realizó 48 horas después y, al quinto día de cultivo, las células estaban listas para ser infectadas (9, 10).

Infección de los cultivos

La infección se realizó utilizando 500 μ L de una dilución 1:10 del *stock* de virus en medio DMEM más 10% SFB. Después de 1 hora de incubación a 37°C, se retiró el virus y se lavaron los cultivos con DMEM. Se adicionó medio fresco más SFB y se incubaron las células durante 48 horas más (11).

Inmunodetección

Después de lavar con PBS, las células se fijaron durante 30 minutos en formaldehído al 4%, preparado por hidrólisis alcalina de paraformaldehído. Para evitar que el cultivo se desprendiera por los sucesivos lavados, se le colocó una capa de gelatina al 1%. Se procedió a la inmunodetección propiamente dicha. Se permeabilizaron los cultivos con 0,1% de tritón X-100 durante 30 minutos. Se inactivó la peroxidasa endógena usando H_2O_2 al 0,3%, preparado en metanol al 10% en PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos incubando 30 minutos con SFB al 10% en PBS. Se incubaron las células por 30 minutos con siete diluciones (1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, 1/1.920) del anticuerpo primario en solución amortiguadora para anticuerpo (tris 0,005 M más NaCl 0,5M más tritón X-100 0,5%, pH 8,6). El anticuerpo primario se obtuvo de hámsters inmunizados con un homogenizado de cerebros de hámster infectados con rabia, el cual se acopla posteriormente a la fluoresceína. A continuación, se lavaron las células con el mismo amortiguador y se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina de hámster biotinilada VECTOR®, Cat BA-9100) a una concentración de 2,5 μ g/mL, preparado en solución amortiguadora para anticuerpo. Después de lavar con PBS, se procedió a la incubación con el complejo avidina-peroxidasa, durante 30 minutos. Finalmente, se procedió al revelado utilizando como sustrato H_2O_2 al 0,02%, diluido en agua destilada y como cromógeno la diaminobenzidina (DAB) al 0,1% (en tris-HCl) durante cuatro minutos. La reacción se detuvo con lavados sucesivos con agua destilada. Los cultivos fueron contracolorados con hemalun de Mayer (durante 20 segundos) y,

luego, deshidratados pasándolos por concentraciones crecientes de etanol, seguido de xilol y montándolos en Permount®.

Se utilizaron cuatro tipos de controles para la inmunodetección:

1. Cultivos infectados, omitiendo el anticuerpo primario.
2. Cultivos no infectados, incluyendo las diferentes diluciones del anticuerpo primario.
3. Cultivos infectados cuya inmunodetección se realizó por el procedimiento normal de inmunofluorescencia directa utilizando la dilución de anticuerpo primario usada en las técnicas de rutina (1:30).
4. Cultivos infectados, incluyendo las diferentes diluciones del anticuerpo primario, pero que no fueron permeabilizados antes de la aplicación del anticuerpo.

Resultados

En los cultivos procesados para inmunoperoxidasa, se observó un efecto muy pronunciado de la concentración del anticuerpo sobre el tipo de marcaje encontrado. En las diluciones 1/30, 1/60, 1/120 y 1/480 (figura 1A y 1B), se marcaron todas las células y las neuronas lo hicieron de forma muy intensa. Esta inespecificidad del marcaje se evidenció, particularmente, en los cultivos no infectados, en los cuales el marcaje fue muy similar al de los cultivos infectados.

Para las diluciones mayores de anticuerpo primario (1/960 y 1/1.920), en los cultivos infectados, se observaron células positivas con pequeñas placas muy intensamente marcadas y células no marcadas (figura 1C). Los controles sin virus no presentan ningún tipo de reactividad (figura 1D).

En los procedimientos por inmunoperoxidasa, los controles sin anticuerpo primario no presentaron ningún tipo de marcaje (figura 1E). Los controles no permeabilizados exhibieron un marcaje muy disminuido, comparados con los cultivos infectados permeabilizados. Finalmente, aquéllos procesados por inmunofluorescencia mostraron células neuronales infectadas

tanto en sus somas como en sus neuritas (figura 1F).

Discusión

Existen varios aspectos interesantes para destacar:

1. Hemos logrado estandarizar una técnica de inmunodetección de células cultivadas que fueron infectadas por virus rábico, utilizando la reacción enzimática entre la peroxidasa, el H_2O_2 y la DAB.
2. El procedimiento permite emplear el anticuerpo antirrábico hecho en hámster que se está utilizando actualmente en el INS.
3. La dilución óptima del anticuerpo primario empleada es unas 30 veces mayor a la utilizada corrientemente para la inmunofluorescencia directa. La preparación es de larga duración y se puede observar y fotografiar con un microscopio de luz ordinario, aun a gran aumento.
4. El conteo de células y su estudio morfológico es relativamente sencillo.

Por otro lado, el hecho que los cultivos no infectados también presenten marcaje (al menos, a las concentraciones más elevadas del anticuerpo primario) necesita una explicación. Una posibilidad reside en la naturaleza del inmunógeno utilizado para la producción del anticuerpo primario. Este inmunógeno es una suspensión relativamente cruda de cerebro de hámster infectado con virus rábico. Es probable que esta suspensión lleve residuos celulares o moléculas provenientes del cerebro del hámster que, a su vez, estimulen la producción de inmunoglobulinas que no estén dirigidas contra el virus de la rabia. Esto podría explicar el hecho que la dilución del antisuero permite una mayor especificidad de la detección, ya que estas inmunoglobulinas *contaminantes* estarían en menor cantidad que las dirigidas contra el virus y con una dilución elevada su título descendería a niveles casi indetectables con la técnica utilizada.

Pensamos que esta reacción inespecífica no es producto de una mala aplicación de la técnica en

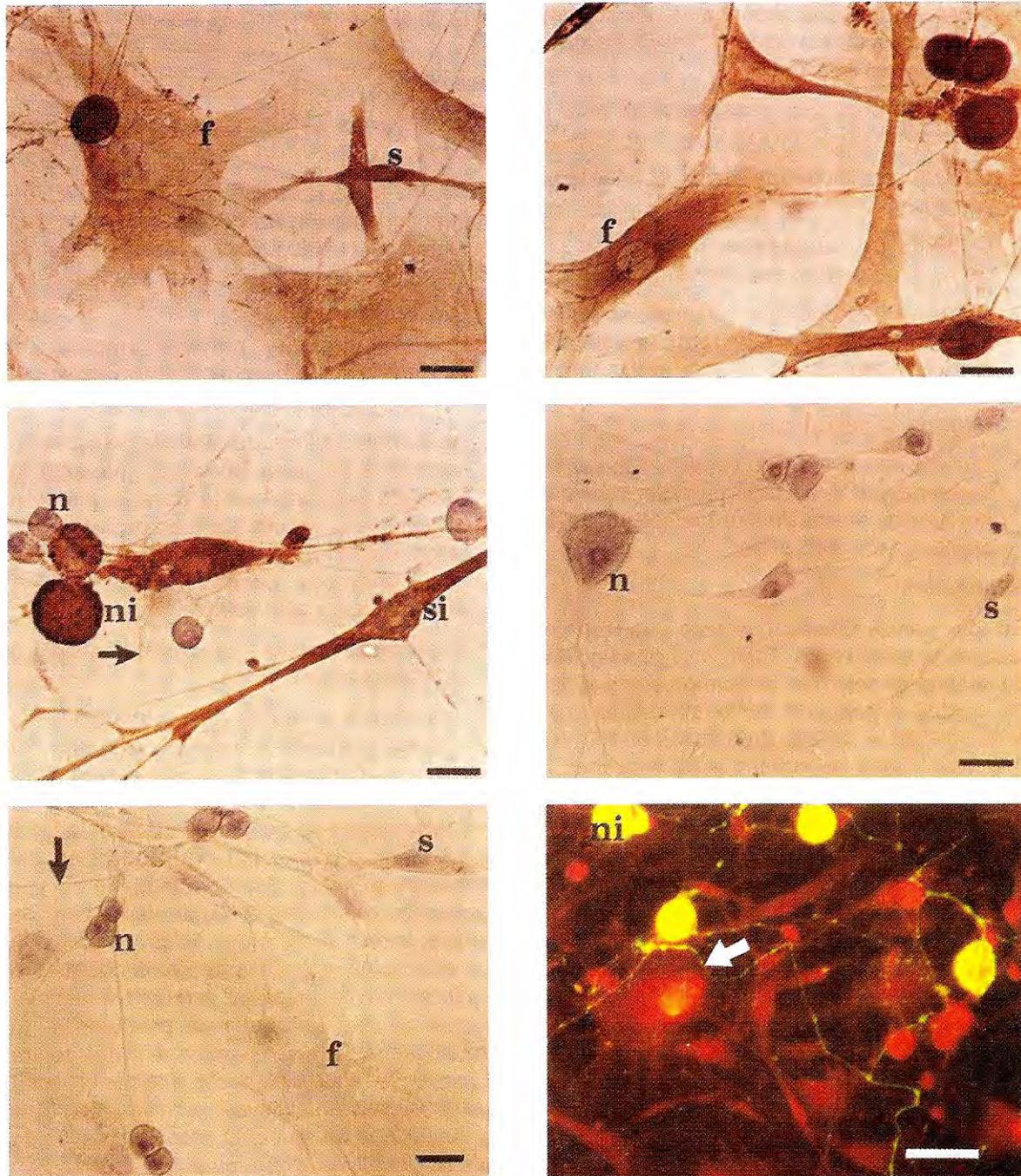


Figura 1. Fotomicrografías de cultivos de ganglio de la raíz dorsal de ratón adulto infectados con virus de rabia y procesados para inmunoperoxidasa; f: fibroblasto, Ni: neurona infectada, n: neurona, flecha: neuritas, s: célula de Schwann, si: célula de Schwann infectada. **A.** Dilución 1/60 de anticuerpo primario en cultivos infectados. **B.** Igual dilución en cultivos sin virus. **C.** Dilución 1/920 de anticuerpo antirrábico en cultivos con virus. **D.** La misma dilución en cultivos de control sin infección. **E.** Cultivo de control infectado en el cual se omitió el anticuerpo primario. **F.** Control por fluorescencia de cultivos infectados; se usó la dilución de rutina del anticuerpo primario (1/30) preparada en azul de Evans. Todas las barras corresponden a 20 μ m.

sí, ya que la omisión del anticuerpo primario no resulta en ningún tipo de marcaje y los controles sin virus en fluorescencia no se marcan tampoco. Además, en numerosos experimentos preliminares, se ensayaron parámetros tales como la concentración de la DAB, el tiempo de revelado, la concentración del anticuerpo secundario, el tipo de amortiguador utilizado y el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, sin que ninguna de las modificaciones eliminara este marcaje inespecífico al utilizar concentraciones elevadas del anticuerpo primario.

Agradecimientos

Agradecemos a Ruth Mosquera y Patricia León del Laboratorio de Control de Calidad de Vacunas del INVIMA quienes nos facilitaron el uso del microscopio de fluorescencia; a Jorge Boshell y Clemencia de Serna por la donación del conjugado antirrábico; y, nuestras gracias especiales a Sonia Cortés y a todo el personal del Laboratorio de Vacuna Antirrábica del INS, por su acogida y su paciencia.

Referencias

1. **Hsu S, Ree H.** Self-sandwich method: an improved immunoperoxidase technique for the detection of small amounts of antigens. *Am J Clin Pathol* 1980;74:32-40.
2. **Hsu S, Raine I, Fanger H.** A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 1981;75:734-8.
3. **Handelmann G, Boyles J, Weisgraber K, Mahley R, Pitas R.** Effects of apolipoprotein E, a-VLDL and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res* 1992;33:1677-88.
4. **Boyles J, Notterpek I, Anderson L.** Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. *J Histochemical Chem* 1990;265:17805-15.
5. **Klosen P.** Techniques immunocytochimiques. Laboratoire de Biologie Cellulaire de L'Université Catholique de Louvain, 1989.
6. **Goldwasser RA, Kissling RE.** Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc Soc Exper Biol Med* 1958;98:219-23.
7. **Dean DJ, Abalseth MK.** Prueba de los anticuerpos fluorescentes. En: Kaplan M, Koprowski H, editores. *La rabia, técnicas de laboratorio.* Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1976:75-87.
8. **Kissling R.** The fluorescent antibody test in rabies. In: Baer G, ed. *The natural history of rabies.* Vol I. Academic Press, 1975:455-61.
9. **Tsiang H, Licke E, Ceccaldi P, Hermine A, Hirardot X.** The anterograde transport of rabies virus in rat sensory dorsal root ganglion neurons. *J Gen Virol* 1989;70:2075-85.
10. **Castellanos J.** Efectos de varios antagonistas colinérgicos nicotínicos en la infección por virus rábico en cultivos primarios de células de ganglio de la raíz dorsal de ratón adulto (Tesis). Santa Fe de Bogotá: Universisnas Nacional de Colombia, 1995.
11. **Castellanos J, Hurtado H, Arias J, Velandia A.** Rabies virus infection of cultured adult mouse dorsal root ganglion neuron. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1996.