

NOTA TECNICA

Evaluación de una técnica capilar modificada para inmunocitoquímica en cultivos adheridos a cubreobjetos de vidrio

Niyibi Y. Quiroga¹, Marlen Martínez¹, Jaime E. Castellanos¹, Hernán Hurtado¹

Resumen

Con el objeto de evaluar una técnica inmunocitoquímica para cultivos celulares adheridos a cubreobjetos, se ensayó una modificación de la técnica capilar comparándola con la técnica convencional (en cajas de 24 pozos). Cultivos de ganglio de raíz dorsal de ratón adulto se sometieron a inmunodetección por peroxidasa e inmunofluorescencia de neurofilamento, proteína S-100 y virus de la rabia; la especificidad e intensidad de la marca con una u otra técnica no cambió. El uso de la técnica capilar modificada significó un ahorro de 92% en los volúmenes de anticuerpos y reactivos usados, sin sacrificar los patrones de marca, sin incrementar el tiempo del procedimiento y usando materiales que corrientemente se encuentran en cualquier laboratorio.

Palabras clave: inmunocitoquímica, técnica capilar, cultivo de neuronas, anticuerpos.

Evaluation of a modified capillary technique for immunocytochemistry of cover-slip adhered cultures

Abstract

In order to evaluate a simple and easy immunocytochemical method for cultured cell monolayers adhered to coverslips, we compared a minichamber technique with the conventional method using 24 well culture plates. Immunocytochemical procedures were carried out on adult mice dorsal root ganglia cultures for fluorescence and peroxidase detection of neurofilament, S-100 protein or rabies virus. Intensity and specificity were similar using both techniques. Primary and secondary antibodies and enzymes volumes saving was 92%, with similar reactivity and no increase in processing time of samples. This technique only requires materials routinely found in the laboratory.

Key words: immunocytochemistry, capillary technique, neuron culture, antibody.

Introducción

En la realización de la mayoría de las técnicas inmunocitoquímicas se requieren volúmenes relativamente grandes de soluciones de incubación, ya sea anticuerpo primario, secundario o complejos enzimáticos, para que la muestra quede totalmente cubierta. Debido al alto costo y a la escasez de algunos anticuerpos

y reactivos de inmunocitoquímica, es necesario buscar técnicas alternativas que permitan optimizar el uso de los reactivos biológicos y reducir los costos sin sacrificar los resultados.

El principio básico de estas modificaciones es la capilaridad, la cual permite que la muestra entre en contacto con mínimos volúmenes de la solución de incubación. Con este fin, varios

¹ Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido, agosto 9 de 1999; aceptado, agosto 26 de 1999

autores han descrito modificaciones a diferentes técnicas de inmunomarcación. Uno de los montajes informados se fabrica con un pequeño recuadro de Parafilm® sellado con vaselina, en medio del cual se encuentra el tejido, el cual debe desmontarse para cada lavado (1). En el diseño mostrado por Nusbickel, la cámara de incubación se hace en acrílico y los reactivos se impulsan con una bomba hacia el interior; el dispositivo permite trabajar con gran número de muestras, pero su fabricación parece ser complicada (2). Comercialmente, se consiguen portaobjetos Probe-On® con un marco de pintura de 75 µm, en medio del cual se ponen los cortes; los marcos se impermeabilizan con silicona, se enfrentan con uno igual y se incuban con pequeños volúmenes de reactivos, ya sea para precipitación argéntica (3) o para fosfatasa alcalina (4). En estos trabajos se han realizado comparaciones con las técnicas convencionales para identificar si la modificación de la técnica interfiere en la intensidad del marca y en la aparición de marca inespecífico, entre otros. Se ha informado sobre ventajas de los procedimientos en cuanto a reproducibilidad de los resultados, facilidad en la realización de la técnica y conservación de las muestras.

Uno de los principales inconvenientes que se presenta cuando se utilizan pequeños volúmenes de solución es la evaporación de los *buffers*, siendo una de las principales causas de los artefactos de sobremarca. Para obviar este problema, se ha recomendado la utilización de cámaras húmedas tanto para incubaciones a 37 °C como a temperatura ambiente (1, 4).

En el presente trabajo, se compararon dos técnicas de inmunomarcación con peroxidasa y fluorescencia: una técnica en cajas de cultivo de 24 pozos (convencional) y una técnica capilar modificada. Para Esta última se utilizó una gradilla de vidrio con pozos de 20 µl de capacidad y una cámara húmeda hermética para las incubaciones. Las inmunocitoquímicas fueron realizadas en cultivos de ganglio de la raíz dorsal adheridos a cubreobjetos de vidrio.

Materiales y métodos

Para la realización del cultivo de ganglio de la raíz dorsal, se usó una metodología informada

anteriormente (5). Brevemente, los ratones se sacrifican por dislocación cervical; a partir de la columna vertebral se obtienen los ganglios que se disocian con colagenasa durante 90 minutos; la suspensión celular se siembra en el centro del cubreobjetos de vidrio previamente tratados con poli-L-lisina. Los cultivos se mantuvieron durante 4 días y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS.

Para realizar las inmunodetecciones en los cultivos, se usó una gradilla elaborada por nosotros. Así, sobre una lámina de vidrio de 16x11x0,5 cm (que sirve como base de los micropozos), se pegaron laminillas de vidrio rectangulares de 8x22x0,1mm con adhesivo de cianoacrilato, recortadas a partir de cubre-objetos corrientes. Éstas laminillas se ubicaron sobre el vidrio, separadas por un espacio de 1 cm, y sobre ellas se colocaron los cubreobjetos redondos con la monocapa hacia abajo, de tal manera que se forma una minicámara, cuyo volumen es de 0,02 cm³, la cual se llenó con los reactivos por medio de una micropipeta (figura 1). El montaje completo se puso dentro de un recipiente plástico de 20x15x5 cm con 30 ml de agua, sin permitir contacto con la lámina de vidrio, y se tapó herméticamente. Luego se llevó a la incubadora a 37 °C. En el fondo del recipiente plástico, se pegaron cuatro tapas de tubos Falcon, sobre las cuales se soportaba la lámina grande de vidrio.

Los anticuerpos evaluados en esta prueba estaban dirigidos para neurofilamento (1:1.000 para peroxidasa, 1:500 para fluorescencia), proteína S-100 (1:8.000 para peroxidasa, 1:1.000 para fluorescencia) y antirrábico 1:1.200 para peroxidasa, 1:30 para fluorescencia). La inmunoperoxidasa y la fluorescencia se desarrollaron de acuerdo con el protocolo establecido en el Laboratorio de Neurociencias del INS (6), modificando solamente el volumen del anticuerpo primario.

Para evaluar si la variación en la técnica capilar alteraba de alguna manera los resultados, se realizó en forma paralela un ensayo con la técnica convencional (en caja de cultivo de 24 pozos). Para la técnica por capilaridad, se usaron 20 µl de reactivos y para la técnica convencional se usaron 280 µl por pozo.

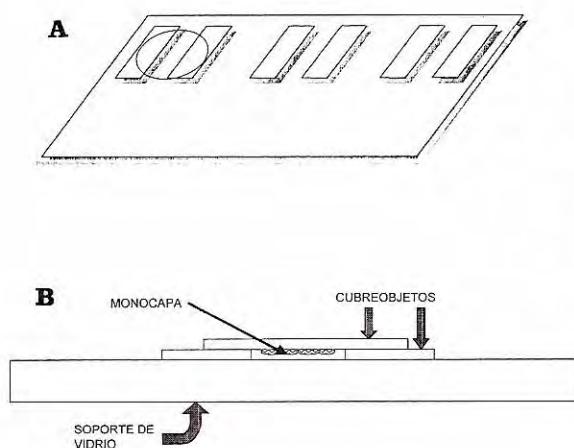


Figura 1. A. Diagrama de la gradilla de minicámaras confeccionada para la incubación de anticuerpos. Sobre la lámina de vidrio grande se pegaron las laminillas y sobre ellas se pone el cubreobjetos redondo con las células. B. Perfil del montaje diseñado para la incubación de los anticuerpos, las laminillas cubreobjetos son recortadas con lápiz de diamante y pegadas al soporte con adhesivo a base de cianoacrilato, la monocapa de células queda hacia el interior del micropozo, que forma una cavidad de 20 μ l.

Antes de la incubación con los anticuerpos y para los lavados, los cubreobjetos con las monocapas permanecieron en las cajas de 24 pozos. Para las incubaciones con los anticuerpos, los cubreobjetos con las monocapas se pasaron a la gradilla de vidrio con ayuda de una pinza de relojero de punta curva # 7, con la monocapa hacia abajo y, luego, se dispensó la solución de anticuerpo o complejo enzimático. Los cultivos procesados para peroxidasa se deshidrataron y se montaron con resina líquida, y los cultivos de fluorescencia se montaron con glicerol tamponado para ser fotografiados.

Resultados

En este trabajo se compararon dos técnicas para la realización de una inmunocitoquímica para monocapas celulares adheridas a cubreobjetos: la técnica convencional (en caja de cultivo) y la técnica modificada (capilar), usando varios anticuerpos, para evaluar si la modificación de la técnica alteraba los resultados del ensayo. Comparada con la técnica convencional, en la técnica capilar en micropozos, la intensidad de

la inmunomarcación no se alteró para ninguno de los 3 antígenos probados y no hubo aparición de artefactos de marca inespecífico (figura 2A-D).

En los cultivos procesados por medio de las dos técnicas comparadas, convencional y capilar, se observó una marca similar. Para neurofilamento, se ven marcados los somas neuronales y, de manera muy prominente la red de prolongaciones citoplasmáticas neuronales (neuritas), tanto en peroxidasa como en immunofluorescencia. La detección de células infectadas por el virus de rabia se evidenció claramente en los cultivos procesados con ambas técnicas; se observaron somas fuertemente marcados (redondos) y neuritas inmunopositivas. En los controles de los procedimientos (cultivos sin adición de anticuerpo primario), no se detectó inmunorreactividad.

Para la realización de la técnica convencional en caja, se emplearon 280 μ l de la solución de anticuerpos para cada micropozo. Este volumen se redujo sustancialmente con el empleo de la técnica capilar a 20 μ l por pozo, lo que significó un ahorro de 92% del volumen utilizado normalmente. Con los anteriores resultados se concluyó que la técnica capilar cumplió con el principal objetivo propuesto, ahorrar reactivos biológicos y, además, arrojar los mismos resultados que la técnica convencional.

Discusión

El empleo de técnicas capilares permite optimizar el uso de los reactivos y, a su vez, disminuye los costos del procedimiento, sin sacrificar la especificidad e intensidad de la inmunomarcación. También proporciona ventajas como la posibilidad de manejar numerosas muestras, utilizar altas diluciones de reactivos biológicos (generalmente costosos) y no modificar su tiempo de incubación (1). Según otros informes, esta técnica se puede aplicar también a otro tipo de especímenes, tales como cortes en parafina (1), cortes congelados (4) y cultivos celulares, que fue nuestro caso, entre otros.

Se recomienda utilizar la técnica capilar sólo para colocar los anticuerpos, en tanto que los demás pasos deben hacerse de forma convencional para evitar que queden residuos de los anticuerpos

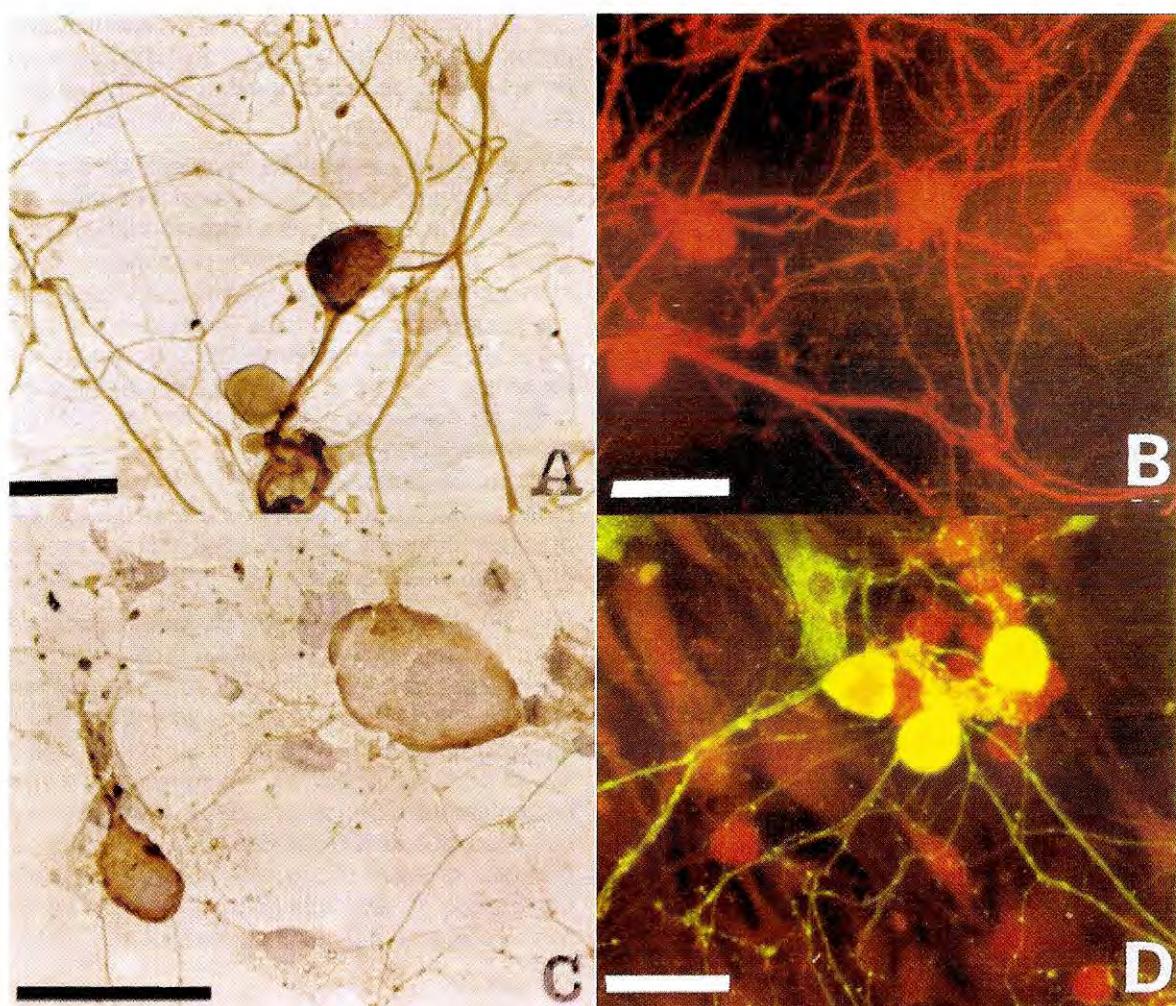


Figura 2. Fotomicrografías de cultivos de ganglio de la raíz dorsal procesados para la detección de varios抗ígenos, por peroxidasa y fluorescencia, usando la gradilla con micropozos; el patrón de marcaje para los抗ígenos probados es similar usando la técnica convencional o la técnica capilar en micropozos. Detección de la subunidad de 200 kDa del neurofilamento por A. inmunoperoxidasa, y por B. inmunofluorescencia indirecta. Inmunodeteción de células infectadas con virus de rabia en cultivo por C. peroxidasa, y por D. inmunofluorescencia directa. Las barras corresponden a 50 μm.

en las paredes de los micropozos por la tensión superficial y no sean removidos en los lavados. Si se desea realizar todo el procedimiento en los micropozos, se recomienda lavar con soluciones con detergentes como Triton X-100 o Tween 80 (3, 7). Se debe prestar especial atención a la formación de burbujas y a la evaporación de los reactivos para evitar problemas como la ausencia de marca y la aparición inespecífica de marca, respectivamente.

El hecho de haber elaborado nosotros mismos una gradilla de micropozos para la incubación de los anticuerpos, contribuyó a la economía del procedimiento, pues evita el uso de portaobjetos comerciales, no requiere de bombas de propulsión de reactivos o cámaras de incubación costosas o complicadas, de tal manera que la construcción de la cámara de capilaridad no eleva los costos.

La técnica evaluada permitió realizar las inmunodetecciones propuestas, sin detrimento de la calidad del resultado y sin aumentar significativamente el tiempo de procesamiento de las muestras, generando un gran ahorro en el uso de costosos reactivos biológicos.

Referencias

1. **Abbuhl F, Velasco M.** An economical minichamber for immunohistochemical incubation. *J Histochem Cytochem* 1985;33:162-4.
2. **Nusbickel F.** The construction of a closed-chambered incubator for use in such techniques as enzyme and immunoperoxidase histochemistry. *J Microscopy* 1980; 118:447-51.
3. **Kumar R, Brayne S, Crouch R.** Immunogold-silver staining by capillary action. *Am J Clin Pathol* 1989;92:773-8.
4. **Kumar R.** Immunogold-silver cytochemistry using a capillary action staining system. *J Histochem Cytochem* 1989; 37:913-7.
5. **Castellanos J, Hurtado H.** Viral infection studied in adult sensory neurons. In: L. Haynes, editor. *The neuron in tissue culture*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1999: 289-93.
6. **Castellanos J, Castañeda D, Hurtado H, Velandia A.** Inmunodetección por peroxidasa de células de ganglio sensorial infectadas por virus de rabia. *Biomedica* 1996; 16:214-8.
7. **Klosen P.** Techniques immunocytochimiques. Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université Catholique de Louvain. 1989:88-90.