

**LA TÈCNICA DE LES PLAQUES PER A LA VALORACIÓ
DE LES CÈL·LULES FORMADORES D'ANTICOSSOS**

Comunicació presentada el dia 15 de febrer de 1973
per

M. ROSA CASTRO

Secció d'Immunoquímica del Departament d'Investigació de l'Hospital
Municipal de Nostra Dona del Mar, de Barcelona

Les tècniques emprades per la immunologia clàssica per a conèixer la resposta immunològica es basen en la valoració d'anticossos a nivell circulant. Actualment, per a un millor coneixement dels mecanismes de formació d'anticossos a nivell cel·lular, han estat desenvolupades tècniques de valoració de les cèl·lules formadores d'anticossos. Hem cregut interessant d'aportar els nostres primers resultats sobre la resposta enfront de l'estimulació antigènica única, mitjançant la utilització d'una d'aquestes tècniques més simples.

Les cèl·lules en activa formació d'anticossos presenten dues modalitats, una en la qual segreguen els anticossos a l'exterior de la cèl·lula, i l'altra en la qual els presenten a la membrana; les tècniques d'estudi d'aquestes cèl·lules varien també segons aquestes dues possibilitats; així, tenim la tècnica de formació de plaques, que permet de detectar les cèl·lules que segreguen una quantitat d'anticòs considerable, i també la tècnica de formació de rosetes, que posa en evidència la presència d'anticossos a la superfície cel·lular, per adherència de l'antigen particular (glòbuls de be), com a tècniques més usades en aquest camp.

JERNE i NORDIN ⁵, el 1963, i INGRAHAM i BUSSARD ⁴, el 1964, proposaren aquesta tècnica de plaques, tècnica que permet de valorar quantitativament les cèl·lules que segreguen anticossos antihemàtics de be, secreció que és detectada per la formació, al voltant de les cèl·lules formadores d'anticossos (cèl·lules actives), de zones de lisi en presència del complement, en estar *in vitro* les cèl·lules en contacte amb l'antigen, en un medi semisòlid. Perquè es formin les plaques d'hemòlisi, les cèl·lules han de secretar una quantitat important d'anticossos.

Posteriorment, aquesta tècnica ha estat sotmesa a nombroses modificacions, com és la de BERGLUND ¹, l'any 1964, que introduí la utilització de capes fines d'agar sobre un porta per a obtenir una bona observació òptica, i per a estudiar la cèl·lula formadora d'anticòs després de fixada i tenyida. CUNNINGHAM ², el 1965, proposà la més simple de les tècniques d'hemòlisi local, amb la utilització en suspensió líquida de leucòcits, glòbuls de be i complement. D'altres modificacions han permès de conèixer la producció d'anticossos antipolisacàrids, proteïnes solubles o haptens, a condició de fixar-se aquests en els glòbuls de be (LANDY i col·lab.⁶).

En el nostre Departament hem aplicat una altra modificació de la tèc-

nica de formació de plaques, la seguida a l'Institut d'Immunobiologia de l'Hospital Broussais de París, utilitzant com a òrgan de treball la melsa, per la importància que té en la dinàmica de la resposta immunològica a escala cel·lular i ensems perquè és fàcil d'obtenir.

Hem aïllat les cèl·lules limfoides de la melsa de ratolins immunitzats amb hematies de be, i hem fet una suspensió d'aquestes cèl·lules en el medi de Hanks, operació que hom duu a terme en fred, com també les que sequeixen. Després rentem la suspensió de cèl·lules de 2 a 3 vegades per centrifugació a 1.200 r. p. m. En la darrera centrifugació hom re-suspèn el sediment en un volum conegut, i prepara suspensions de diverses concentracions. Hom escalfa tot el material a 45 °C; en un porta són homogeneïtzades les cèl·lules de la melsa i les hematies de be, amb agarosa, operació que serà duta a terme amb cada una de les diferents concentracions, i hom

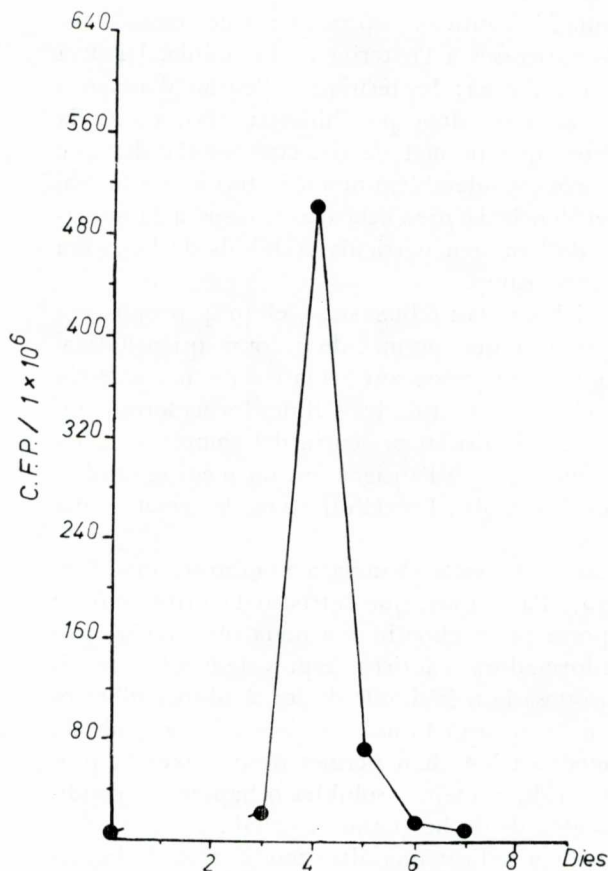


FIG. 1. — Corba resposta de cèl·lules formadores de plaques per 1×10^6 cèl·lules de la melsa. Cada punt correspon a la mitjana de 12 ratolins inoculats amb una solució al 20 % de glòbuls de be

prepara dos portes per a cada concentració; després, els portes són incubats en cambra humida, a 37 °C, durant una o dues hores. En aquest període de temps els anticossos es difonen en el medi, i es fixen en les hematies de be més properes. L'addició posterior de complement absorbit amb glòbuls de be, a una concentració de 10 %, realitza la lisi de les hematies sensibilitzades, amb la consegüent aparició de les plaques d'hemòlisi. La lectura en pot ésser determinada amb un projector o al microscopi, i cada placa d'hemòlisi correspon a una cèl·lula secretora d'anticossos. De tots els portes preparats amb les diverses dilucions, són considerats únicament els que permeten una lectura més clara. Amb aquesta tècnica hom obté les cèl·lules sintetitzadores d'anticossos del tipus Ig M, d'una forma directa.

Els primers resultats de les experiències dutes a terme amb la tècnica de cèl·lules formadores de plaques són expressats a les figures 1 i 2, on

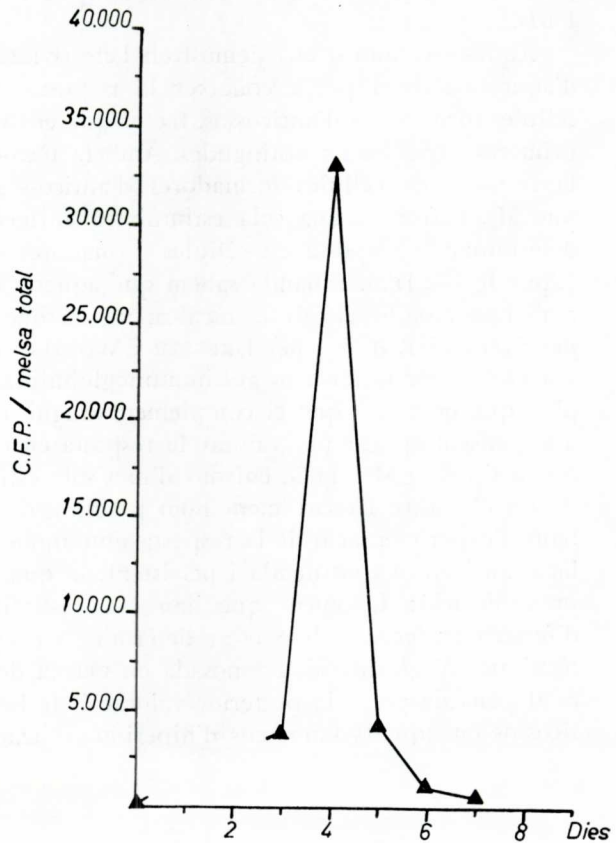


FIG. 2. — Corba resposta de cèl·lules formadores de plaques per melsa total, dels mateixos ratolins corresponents a la gràfica de la figura 1

cada punt equival a la mitjana de 12 ratolins immunitzats amb una sola dosi d'hematies de be; resultats que són donats en nombre de plaques formades per 1×10^6 cèl·lules (fig. 1) i en nombre de plaques formades per melsa total (fig. 2). Els ratolins sacrificats al cap de tres dies després de la immunització donen una resposta considerable: 29 plaques per 1×10^6 cèl·lules, que correspon a 3.850 plaques per melsa total. La màxima resposta la presenten els ratolins sacrificats al cap de quatre dies després de la immunització, amb un nombre de plaques de 503 per 1×10^6 cèl·lules, o sigui 33.008 plaques per melsa total. El cinquè dia, la resposta ha disminuït a 74 plaques per 1×10^6 cèl·lules, que equival a 5.558 plaques per melsa total; el nombre de plaques d'hemòlisi continua disminuint en dies successius. Els ratolins no immunitzats donen una petita resposta enfront de les hematies de be, valor que nosaltres hem detectat d'1,6 plaques per 1×10^6 cèl·lules, la qual cosa equival a 66 plaques per melsa total. Les corbes obtingudes presenten un nivell de resposta més baix que no pas el donat per l'Institut d'Immunobiologia de l'Hospital Broussais de París.

Aquests resultats, ens demostren l'efectivitat que pot tenir l'aplicació d'aquesta tècnica per a conèixer la resposta immunològica a escala de cèl·lules formadores d'anticossos, factor que ens indueix a ampliar aquestes primeres experiències obtingudes. Amb la tècnica emprada hem obtingut la resposta de cèl·lules formadores d'anticossos altament hemolítics (tipus M), enfront d'una sola estimulació antigènica, però no hem pogut determinar la resposta en cèl·lules formadores d'anticossos no hemolítics (tipus Ig G). D'altra banda sabem que aquesta darrera pot ésser valorada amb una modificació de la tècnica, un mètode indirecte exposat el 1965 per STERZL i RIHA ⁷, i per DRESSER i WORTIS ⁸ el mateix any, i que consisteix a afegir un anticòs antiimmunoglobulina, el qual formarà un complex que permetrà que el complement dugui a terme l'hemòlisi; tècnica que pensem aplicar per valorar la resposta en cèl·lules productores d'anticossos tipus Ig M i Ig G, enfront d'una sola estimulació antigènica.

En el nostre Departament hom practica, des del 1956, nombrosos treballs d'experimentació de la resposta immunològica, enfront d'una estimulació antigènica continuada i persistent, la qual cosa respon a una hiperimmunització; fenòmens que han estat estudiats en conills enfront de diferents antigens, i han estat determinats els anticossos circulants amb tècniques d'aglutinació. La posada en marxa de la tècnica de plaques ha estat pensada per a la posterior valoració de les cèl·lules formadores d'anticossos en aquests fenòmens d'hiperimmunització en ratolins.

BIBLIOGRAFIA

1. BERGLUND, K.: *A micro slide method per mitting antiradiography of haemolysin producing cells.* «Nature», 204: 89 (1964).
2. CUNNINGHAM, A.: *A method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells.* «Nature», 207: 1106 (1965).
3. DRESSER, D. i WORTIS, H.: *A localized haemolysis in gel method for the detection of cells producing 7S antibody. Use of an antiglobulin-serum to detect cells producing antibody with low haemolytic efficiency.* «Nature», 208: 859 (1965).
4. INGRAHAM, J. i BUSSARD, A.: *Application of localized haemolysin reaction for specific detection of individual antibody forming cells.* «J. exp. Med.», 119: 667 (1964).
5. JERNE, N. K. i NORDIN, A. A.: *Plaque formation in agar by single antibody producing cells.* «Science», 140: 405 (1963).
6. LANDY, M., SANDERSON, R. P. i JACKSON, A. L.: *Humoral and cellular aspects of the immune response to the somatic antigen of Salmonella enteritidis.* «J. exp. Med.», 122: 483 (1965).
7. STERZL, J. i RIHA, J.: *Detection of cells producings 7S antibodies by the plaque technique.* «Nature», 208: 858 (1965).