

Utilitat d'un antiserum obtingut a partir del teratocarcinoma per a l'estudi del llinatge cel.lular.

I. Serra, M. Monzó, B. Torres, A. Torregrosa, M. Amat, i D. Ruano-Gil.
Departament Anatomia Humana, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

Abstract

The study of cell lineages through the use of an antiserum obtained from teratocarcinoma.

We have obtained a type of embryoid body that shows morphological and biochemical characteristics of visceral endoderm. This type of embryoid body was used as an immunogen to produce a rabbit antiserum. This antiserum shows specific affinity towards embryonic mouse visceral endoderm of 6 to 9 days of gestational age. Moreover this antiserum positively reacts with ascitic fluid and serum of teratocarcinoma carrying mice.

Introducció

Els teratocarcinomes (TC) són tumors malignes que es caracteritzen per la coexistència de dues poblacions cel.lulars, una diferenciada i altra indiferenciada anomenada de carcinoma embrionari (CE).

Aquests tumors poden presentar-se tant en forma sòlida com ascítica; i és aquesta última la que fa del TC un model d'estudi molt útil al laboratori ja que en líquid ascític s'hi troben uns agregats cel.lulars (anomenats cossos embrioids -EB- per la seva similitud morfològica amb embrions joves de ratolí) que permeten el manteniment "in vivo" del tumor per successius passatges intraperitoneals.

Els EB estan formats per una coberta cel.lular externa de tipus endodèrmic que envolta a un nombre variable de cèl.lules de CE, trobant-se barrejades en el líquid ascític les diferents formes que poden presentar. L'evolució d'aquestes formes així com el seu mètode de separació han estat extensament estudiats per Monzó (1984).

Està ampliament acceptada la validesa del model per a l'estudi dels processos de diferenciació a mamífers (Martin, 1977). Un dels aspectes en que s'utilitza com a tal, és en l'estudi immunològic, observant-se que existeix una important comunitat antigènica entre els EB i diferents teixits embrionaris, adults, neoplàsics i cèl.lules germinals. Aquests treballs han estat realitzats mitjançant la utilització de diversos antisera obtinguts a partir de productes del TC (Artzt et al, 1973; Boon et al, 1974; Nicolás et al, 1976; Fellous et al, 1974; Dewey et al, 1977; Webb, 1980).

En el present treball separem una població d'EB derivats del TC amb ca-
racterístiques morfològiques i bioquímiques d'endoderm visceral (EV). A
partir d'ella obtenim un antisèrum xenogenètic que presenta un marcatge
selectiu davant l'EV embrionari i del sac vitel·lí d'embrions de ratolí
de 6 a 9 dies d'evolució.

Material i Mètodes

Obtenció de l'antisèrum

Tumor: treballam amb EB derivats del TC OTT6050 obtingut per Stevens en
1970, implantant embrions de ratolí de la soca 129/Sv de 6 dies d'evolució
al testicle d'un ratolí adult isogènic.

Immunogen: Els EB són extrets de la cavitat abdominal amb líquid de HANK'S
lliure de Ca^{++} i Mg^{++} . En gradients de densitat discontinus de Ficoll al
35, 20, 10, 8 i 6 % (V/P) s'introdueix la mostra barrejada amb la banda
del 8 %. Realitzem centrifugació (1000 rpm, 15 min, 4 °C) extraiem la in-
terfase situada a la part superior del tub, i aquesta es caracteritzada
morfològicament, després de ser processada segons tècniques habituals, per
la seva observació ultraestructural.

Immunitzacions: S'injecta una concentració de 16×10^5 EB extrets en la
mencionada interfase (1 dosi/ 15 dies / 3) viandovenosa a conills mascles
Nova Zelanda Albins. Als 10 dies de l'última sensibilització es procedeix
a l'extracció sanguínia i el sèrum obtingut es desactivat mitjançant ca-
lor (56 °C, 30 min).

Absorcions: L'antisèrum és absorbit durant 1 h a 4 °C amb els següents tei-
xits : a.- Amb un homogeneïtzat de teixits adults (cervell, testicle, mel-
sa, ronyó i pulmó de ratolins 129/Sv), disgregats suaument en PBS mitjan-
çant un homogeneïtzador de Teflon.

b.- Amb la població d'EB utilitzada com a immunogen.

Passat aquest temps es centrifuga (2.500 g, 30 min) i s'extreu el sobrene-
dant que s'utilitzarà com a antisèrum absorbit.

Activitat de l'antisèrum

Es determina segons quatre aspectes:

Citotoxicitat: S'incuben els EB en una bateria de dilucions creixents d'an-
tisèrum (30 min, 37 °C, 5 % CO_2 i aire). A continuació, i en les mateixes
condicions són incubats amb complement de conill a dilució 1/40, durant 45
min. Determinant-se la viabilitat cel·lular mitjançant la lectura de capta-
ció de "Trypan Blue".

Electroforesi i "Electroblotting": Els EB són lisats i sotmesos a una electroforesi en gels d'acrilamida-SDS al 12 %, d'1 mm de gruix (segons mètode de Laemmli, 1970), i posteriorment tenyits amb "coomassie brillant blue" observant-se així les diferents proteïnes presents en la mostra.

S'utilitzen gels al 12 % d'1,5 mm de gruix per a realitzar la transferència de les proteïnes problema a papers de nitrocel.lulosa, segons la tècnica de l'electroblotting (Towbin et al, 1979; Bittner et al, 1980). Posteriorment es realitza una primera incubació amb tres anticossos diferents (antisèrum obtingut a partir de la població d'EB, anti- α FP, Antitransferrina) i una segona amb un anticòs conjugat amb peroxidasa, l'activitat de la qual es determina mitjançant diaminobenzidina (DAB).

Com a controls es repeteix la tècnica ometent o la primera incubació o ambdues.

Immunohistoquímica: Es sacrifiquen ratolins femelles 129/Sv gestants de 6 a 9 dies d'evolució (dia de "plug" positiu = dia 0). Els embrions obtinguts són rentats en PBS (0.01 M, pH 7.2), fixats segons el mètode de Sainte-Marie (1962), deshidratats, inclosos en parafina i seccionats a 5 μ m.

Les seccions són desparafinades (xilol 2 x 5 min) hidratades en successives dilucions d'alcohol amb PBS, i inhibides les peroxidases endògenes amb una solució d' 1.7 ml H₂O₂ al 0.5 % amb 100 ml d'alcohol metílic. Després d'aquest tractament es realitzen les següents incubacions específiques:

1^a incubació: Antisèrum obtingut a partir de la població d'EB a dilució 1/200 amb PBS (30 min, t^a ambient).

2^a incubació: IgG de cabra anticonill conjugada amb peroxidasa (MILES) a dilució 1/400 amb PBS (30 min, t^a ambient).

L'activitat peroxidàsica s'evidencia mitjançant una disolució de DAB. Finalment les seccions són contrastades amb OsO₄ a l'1 %.

Controls: - omissió de la 1^a incubació.

- omissió d'ambdues incubacions.

- 1^a incubació amb sèrum de conill no immunitzat.

- 1^a incubació amb antisera absorbits.

Dot: Es realitza un "dot immunobinding assay" (Hawkes, 1982) fent servir com a mostra sèrum i ascites d'animals portadors de TC i sèrum d'animals normals.

Sobre papers de nitrocel.lulosa es posen les mostres a estudiar en dilucions creixents (pura, ..., 1/320). S'inhibeixen les peroxidases endògenes com hem descrit anteriorment, canviant el metanol per PBS, procedint-se a les incubacions específiques:

1ª incubació: antisèrum obtingut a partir de la població d'EB (1h) a dilucions creixents (1/200,..., 1/12.800).

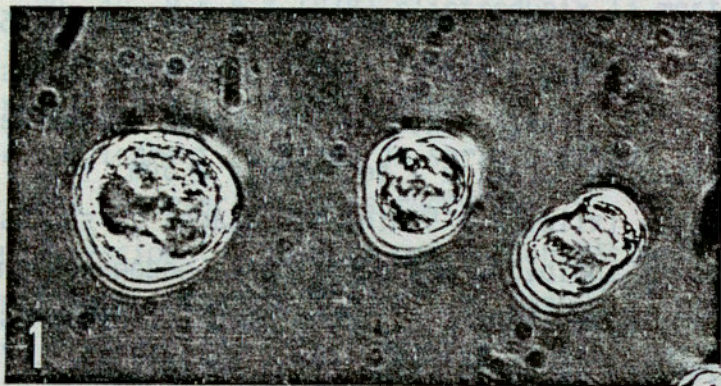
2ª incubació: IgG de cabra anticonill conjugada amb peroxidasa (MILES) (1 h) a dilució 1/400.

L'activitat peroxidàsica es determina segons la tècnica descrita abans.

S'utilitzen els mateixos controls que en "l'electroblotting".

Resultats

Separació, aïllament i caracterització morfològica de l'immunogen: Mitjançant la centrifugació dels gradients de flotació separem una població d'EB que, observada al microscopi electronic d'escandallatge i al microscopi invertit (fig. 1), presenta una gran homogeneïtat. Així mateix la microscòpia



òptica de talls semifins manifesta l'absència de cèl.lules de CE en el seu interior, es a dir, són EB formats exclusivament per una coberta externa de tipus endodèrmic amb característiques ultraestructurals d'EV (presència de complexes d'unió, nombrosos mi-

crovillis, vacúols de pinocitosi i lisosomes amb escàs RER), (Enders et al, 1978; Hogan i tilly, 1981).

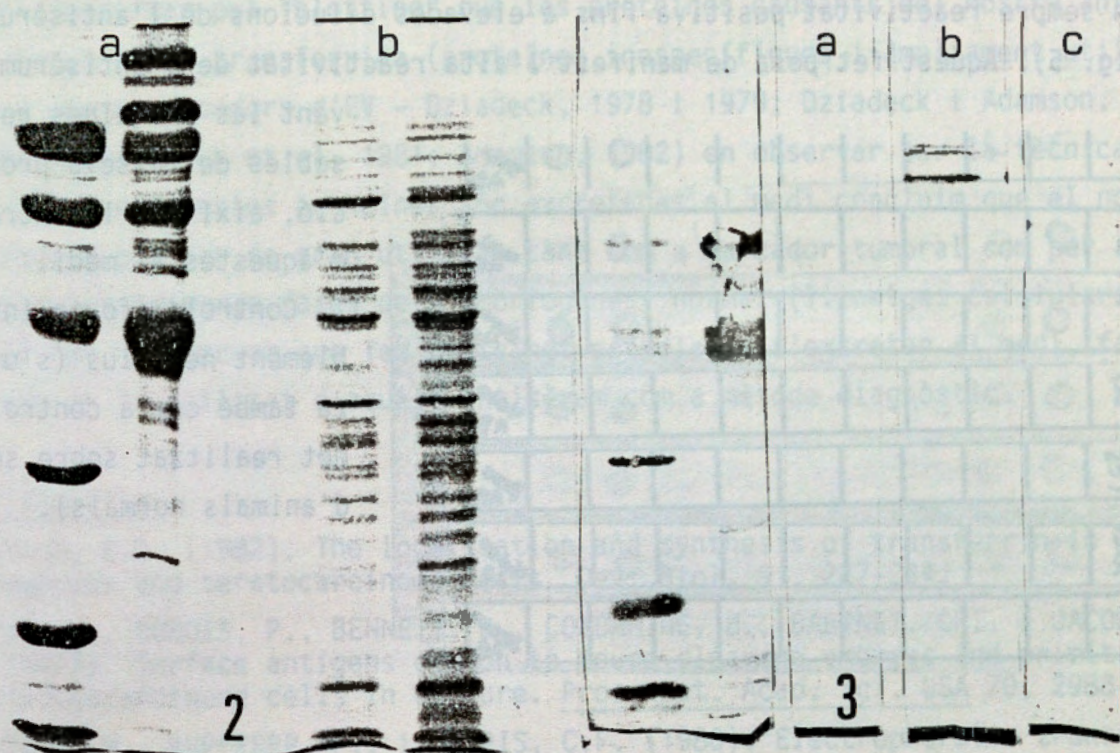
Activitat de l'antisèrum

Test de citotoxicitat: Observem que hi ha un 50 % de lisi cel.lular dels EB utilitzats com a immunogen a la dilució 1/1.024 de l'antisèrum. S'obtenen els mateixos resultats quan l'antisèrum ha estat absorbit amb teixits adults. Per altra banda, quan l'antisèrum és absorbit amb els EB utilitzats com a immunogen no hi ha lisi cel.lular.

Electroforesi i "electroblotting": L'electroforesi posa de manifest la presència d'un ampli espectre de bandes proteiques presents en els EB (Fig.2b) El pes molecular de les mateixes es calculat a partir de l'electroforesi de proteïnes de pes molecular conegut (Fig. 2a).

Mitjançant "l'electroblotting" i després de la incubació amb els diferents anticossos obtenim els resultats següents:

- Antisèrum obtingut a partir de la població d'EB: S'observa marcatge sobre un petit nombre de bandes proteiques (de 3 a 5), el pes molecular de les

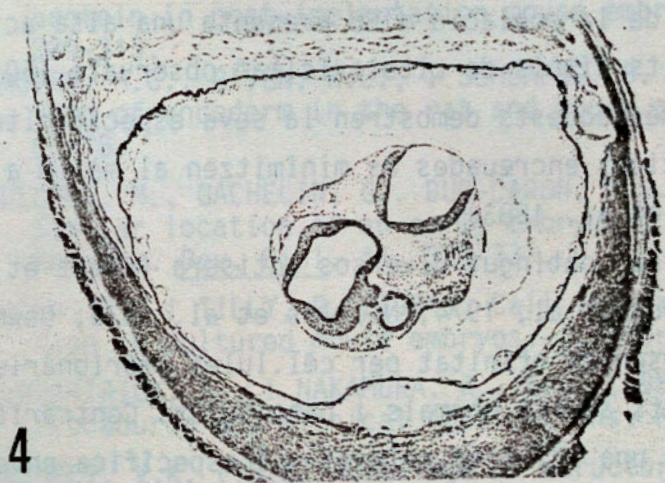


quals es troba comprés entre 90 i 100 Kd. (Fig. 3b).

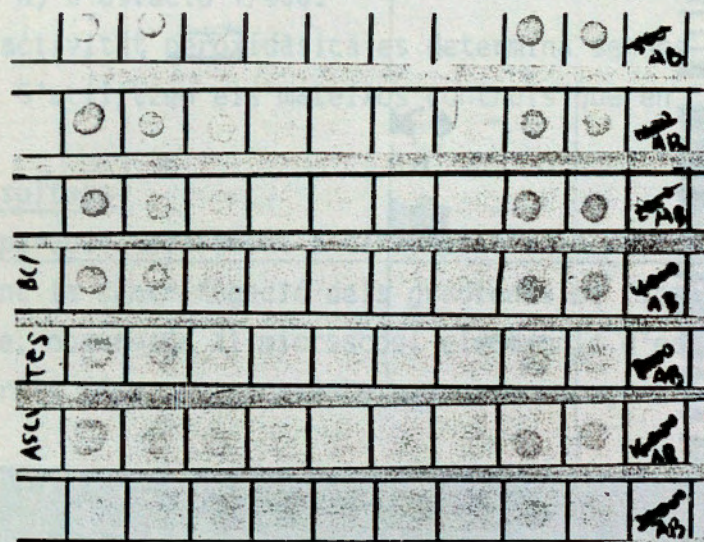
- Antisera anti- α FP i antitransferrina: Amdós antisera presenten reactivitat positiva sobre la població d'EB estudiada, marcant respectivament proteïnes de 66 i 70 Kd (Fig. 3a i 3b). Aquest fet confirma el caràcter d'EV de la població d'EB utilitzada; així com que les proteïnes detectades pel nostre antiserum són de naturalesa diferent a l' α FP i a la transferrina.

Immunohistoquímica: La reacció immunoperoxidàsica realitzada sobre embrions de ratolí evidencien l'alta especificitat del nostre antiserum per a les cèl.lules de tipus EV embrionari i extraembrionari d'embrions de 6 a 7 1/2 dies d'evolució, així com per a les cèl.lules de tipus EV extraembrionari que formen el sac vitel·lí d'embrions de 8 i 9 dies d'evolució (Fig. 4).

Tots els controls realitzats foren negatius.



Dot: El dot realitzat sobre ascites i sèrum d'animals portadors de TC, dona ren sempre reactivitat positiva fins a elevades dilucions de l'antisèrum, (Fig. 5). Aquest fet posa de manifest l'alta reactivitat de l'antisèrum da-



vant les proteïnes respon-
sables de la seva produc-
ció, així com la excreció
d'aquestes al medi.

Controls: foren invaria-
blement negatius (s'utilit-
za també com a control el
dot realitzat sobre sèrum
d'animals normals).

Discussió

En el present treball descrivim un mètode de separació que ens permet aïllar un tipus molt concret d'EB. La qual cosa dóna suport a la idea de Mar-
tin et al (1977) sobre l'existència de més d'un tipus d'EB, idea ja confir-
mada per Monzó (1984) al separar i aïllar quatre tipus morfològics d'EB.

Pierce et al (1962), treballant amb poblacions totals d'EB, observaren en
determinades ocasions la presència de cèl.lules d'endoderm parietal en la
coberta externa dels EB. Per altra banda, les dades morfològiques i bioquí-
miques aquí presentades ens permeten afirmar que els EB aïllats estan for-
mats únicament per cèl.lules d'EV. Tots aquests resultats indiquen l'exis-
tència d'ambdós tipus d'endoderm en la coberta externa dels EB.

L'antisèrum obtingut a partir de la població d'EB presenta una alta acti-
vitat tal com ho demostren els alts títols de citotoxicitat observats (50 %
de lisi a dilució 1/1.024). Endemés aquests demostren la seva especificitat
ja que es considera que les reaccions encreuades es minimitzen al màxim a
partir de dilucions 1/100 (Polak et al, 1983).

A partir de derivats del TC s'han obtingut diversos antisera (Artzt et
al, 1973; Boon et al, 1974; Fellous et al, 1974; Nicolás et al, 1976; Dewey
et al, 1977; Webb, 1980), que presenten afinitat per cèl.lules embrionàries
però també per cèl.lules de teixits adults normals i patològics. Contrària-
ment el nostre antisèrum presenta una afinitat selectiva i específica envers

les cèl.lules de tipus EV.

En descartar pel "blotting" que les proteïnes causants del nostre antiserum foren FP i transferrina (proteïnes inespecífiques i àmpliament utilitzades com a marcadors d'EV - Dziadeck, 1978 i 1979; Dziadeck i Adamson, 1978; Kirkpatrick et al, 1981; Adamson, 1982) en observar per la tècnica del dot que aquestes proteïnes són excretades al medi concluïm que el nostre antiserum pot ser de gran utilitat tant com a marcador tumoral com per a estudiar les primeres fases de l'embriogènesi normal (llinatges cel.lulars).

El fet d'observar que les proteïnes estudiades s'excreten al medi, fan pensar en la utilitat d'aquest antiserum com a mètode diagnòstic.

Bibliografia

- ADAMSON, E.D. (1982). The localisation and synthesis of transferrin in mouse embryos and teratocarcinoma cells. Dev. Biol. 91, 227-234.
- ARTZT, K., DUBOIS, P., BENNETT, D., CONDAMINE, H., BABINET, CH., i JACOB, F. (1973). Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2988-92.
- BITTNER, M., KUPFERER, P., i MORRIS, C.F. (1980). Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzylxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. Anal. Biochem. 102, 459-471.
- BOON, T., BUCKINGHAM, M.E., DEXTER, D.L., JAKOB, H., i JACOB, F. (1974). Tèratocarcinome de la souris: isolement et propriétés de deux lignées de myoblastes. Ann. Microbiol. (inst. Pasteur) 125 B, 13-28.
- DEWEY, M.J., GERHART, J.D., i MINTZ, B. (1977). Protein patterns of developmentally totipotent mouse teratocarcinoma cells and normal early embryo cells. Dev. Biol. 55, 359-374.
- DZIADECK, M. (1978). Modulation of alphafoetoprotein synthesis in the early postimplantation mouse embryo. J. Embryol. exp. Morph. 46, 135-146.
- DZIADECK, M. (1979). Cell differentiation in isolated inner cell masses of mouse blastocyst in vitro: onset of specific gene expression. J. Embryol. exp. Morph. 53, 367-379.
- DZIADECK, M., i ADAMSON, E. (1978). Localization and synthesis of alphafoetoprotein in post-implantation mouse embryos. J. Embryol. exp. Morph. 43, 289-313.
- ENDERS, A.C., GIVEN, R.L., i SCHLAFKE, S. (1978). Differentiation and migration of endoderm in the rat and mouse at implantation. Anat. Rec. 190, 65-78.
- FELLOUS, M., GACHELIN, G., BUC-CARON, M.H., DUBOIS, P., i JACOB, F. (1974). Similar location of an early embryonic antigen on mouse and human spermatozoa. Dev. Biol. 41, 331-337.
- HOGAN, T., i TILLY, R. (1981). Cell interactions and endoderm differentiation in cultured mouse embryos. J. Embryol. exp. Morph. 62, 379-394.
- KIRKPATRICK, A., i NAKAMURA, R., Eds. (1981). Alphafoetoprotein Laboratory. Procedures and Clinical Applications. Masson, Publishing, New York.
- LAEMMLI, V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly

- of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- MARTIN, G.R. (1977). The differentiation of teratocarcinoma cells in vitro: Parallels to normal embryogenesis. In: Cell interactions in differentiation, (Karkinen, M., Saxen, L., i Weiss, L., Eds.), Academic Press, London.
- MONZO, M. (1984). Aislamiento, crecimiento y capacidades de diferenciación de las células de carcinoma embrionario del teratocarcinoma. Tesis Doctoral. Barcekona.
- NICOLAS, J.F., AVNER, P., GAILLARD, J., GUENET, J.L., JAKOB, H., i JACOB, F (1976). Cell lines derived from teratocarcinoma. Cancer Res. 36, 4224-31
- PIERCE, C.B., MIDGLEY, A.R., RAM, J.S., i FELDMAN, J.D. (1962). Parietal yolk sac carcinoma: clue to the histogenesis of Reichert's membrane of the mouse embryo. Amer. J. Pathol. 41, 549-566.
- POLAK, J.M. i VanNOORDEN, S., Eds. (1983). Immunocytochemistry. Practical applications in Pathology and Biology. John Wright PSG inc., Massachusetts, USA.
- SAINTE-MARIE, G. (1962). A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. J. Histochem. Cytochem. 10, 250-256.
- STEVENS, L.C. (1970). The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos Dev. Biol. 21, 364-382.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., i GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.
- WEBB, C.G. (1980). Characterization of antisera against mouse teratocarcinoma OTT6050: molecular species recognized on embryoid bodies, preimplantation embryos and sperm. Dev. Biol. 76, 203-214.