

## FIXAÇÃO COM FORMALDEÍDO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA SELECTIVA DE ANTIGÉNIOS DE MEMBRANA

*J. Vasconcelos-Costa*

Grupo de Virologia, Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, 2781 Oeiras Codex. Portugal.

### RESUMO

Evidencia-se, por imunofluorescência, um componente de membrana do antígeno T específico do adenovírus tipo 12 em células transformadas por esse vírus fixadas com formaldeído. A localização do antígeno na membrana celular demonstra-se por prova de ligação de *S. aureus*. Os componentes intracelulares do antígeno T não se observam nas células fixadas com formaldeído e a impermeabilidade celular garantida por essa fixação demonstra-se pela negatividade de imunofluorescência com o soro anti-actina.

A evidenciação por imunofluorescência de antígenos localizados na membrana celular exige: 1.º) que não haja reacção com antígenos intracelulares que mascarem a reacção de membrana ou ponham em dúvida a localização do antígeno; 2.º) que o tratamento das células não modifique as relações estereoquímicas com os demais componentes da membrana, tornando o antígeno críptico.

A fixação com solventes orgânicos (acetona ou álcoois), usada de rotina na imunofluorescência, não cumpre o primeiro desiderato pelo que tem sido corrente usar células não fixadas, logo impermeáveis aos anticorpos, e tratadas por imunofluorescência em suspensão.<sup>1-3</sup> Esta técnica, se tem vantagens práticas sobre outras técnicas imunológicas para antígenos de membrana, tais como a citotoxicidade,<sup>4</sup> não deixa de ser fastidiosa e de resultados frequentemente difíceis de interpretar.

Mautner e Hyness puderam visualizar por imunofluorescência a proteína de membrana LETS fixando as células com formaldeído. Deppert e Pates<sup>6</sup> tentaram esta técnica para a observação do antígeno T de membrana específico do SV40 mas só obtiveram resultados positivos com soro anti-antígeno desnaturado, o que indica não se cumprir o segundo desiderato atrás enunciado.

As células transformadas pelo adenovírus tipo 12 (Ad12) possuem um antígeno T de membrana que não é evidenciável, por ambas as razões apontadas, por imunofluorescência em suspensão.<sup>7,8</sup> Neste trabalho usa-se esse antígeno para demonstrar que a fixação com formaldeído pode ser um método adequado e simples para a evidenciação de antígenos de membranas.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### *Células*

Cultivaram-se células THA, originadas de um tumor de criceto induzido pelo adenovírus tipo 12 (Ad12), em meio MEM com concentração de Ca<sup>++</sup> reduzida a 0,1 mM e suplementado com 10 % de soro bovino inativado.

### Soros imunes

- 1) Soro anti-T: obtido de cricetos portadores de tumores produzidos por transplantação subcutânea de células THA.
- 2) Soro anti-actina: produzido em coelho por injeção intramuscular semanal, seis vezes, de 0,5-1 mg de actina purificada (Sigma) misturada com adjuvante de Freund incompleto. Colheu-se o soro 10 dias depois da última inoculação.
- 3) Soro conjugado com FITC: obtiveram-se comercialmente (Miles) IgG de coelho anti-IgG de criceto e IgG de cabra anti-IgG de coelho, ambas conjugadas com isotiocianato de fluoresceína.

### Imunofluorescência

Fixaram-se com formaldeído ou com acetona células cultivadas em *monolayer*, sobre lamelas. Para a fixação com formaldeído, lavaram-se as células com PBS completo (com  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$ ) e fixaram-se imediatamente com formaldeído a 3,5 % em PBS, durante uma hora, a 0° C. A fixação com acetona, depois de lavagem com PBS, foi feita a 4° C durante 15 minutos, seguida de secagem rápida ao ar.

Depois de lavadas com PBS, incubaram-se as células com soro imune ou normal durante 45 minutos, a 37° C. e seguidamente, nas mesmas condições, com soro conjugado com FITC. No fim de cada uma das incubações lavaram-se as células três vezes com PBS, sendo a última destas lavagens durante 10 minutos.

Montaram-se as lamelas em glicerol-PBS (9:1) e observaram-se em microscópio Zeiss com lâmpada HBO-200, filtro de excitação FITC, e condensador de fundo escuro. Fotografou-se com filme Kodak Tri-X-Pan.

### Prova de adsorção de *Staphylococcus aureus*

Fixaram-se com formaldeído, como para imunofluorescência, células THA cultivadas sobre lamelas. Depois de lavadas com PBS, incubaram-se uma hora, à temperatura ambiente, com soro anti-T ou soro normal de criceto e lavaram-se três vezes, durante 10 minutos, com PBS. Em seguida, incubaram-se a 4° C, durante 30 minutos, com uma suspensão a 1 % em PBS de *S. aureus* (Cowan I) preparada segundo Kessler.<sup>9</sup> Lavaram-se extensivamente as células, primeiro com PBS contendo 0,1 % de SDS, durante 10 minutos, e em seguida com PBS, sob controlo microscópico, até considerável redução de fundo inespecífico. Montaram-se as lamelas em PBS e observaram-se em microscópio de contraste de fase.

## RESULTADOS

A Fig. 1 mostra as diferenças de padrão de imunofluorescência do antigénio T do Ad12 em células fixadas com acetona e com formaldeído. Nas células fixadas com acetona (Fig. 1a) observa-se antigénio T nuclear, sob a forma bem conhecida de pinçeladas e de grânulos, bem como fluorescência específica difusa no citoplasma. Não é possível reconhecer-se claramente qualquer fluorescência como inequivocamente localizada na membrana celular.

As células fixadas com formaldeído mostram um padrão de imunofluorescência diferente (Fig. 1b). A fluorescência aparece como um retículo fino que cobre todo o citoplasma e desenha bem o contorno das células. Aparentemente, a zona nuclear não está corada, mas isso deve-se ao diferente plano de focagem. Focando o plano da mem-

brana sobre o núcleo pode então observar-se nessa zona o mesmo retículo fluorescente. Em nenhum plano de focagem se observa o clássico padrão imunofluorescente do antígeno T intranuclear.

Em qualquer dos casos, o soro normal de criceto deu resultados claramente negativos.

A selectividade para antígenos de membrana da fixação com formaldeído foi confirmada de duas formas: em primeiro lugar, usando um anti-soro, contra uma proteína exclusivamente intracelular, no caso a actina; em segundo lugar, demonstrando a localização de membrana da reactividade do soro anti-T mediante uma técnica de imuno-adsorvente tirando partido da afinidade da proteína A do *S. aureus* para a zona Fc das IgG.

A Fig. 2 mostra que o soro anti-actina cora intensamente a actina das células THA fixadas com acetona, que aparece com o seu característico padrão fibrilhar, por vezes muito condensado (Fig. 2a). Porém, as células fixadas com formaldeído não permitem a visualização da actina (Fig. 2b).

Na Fig. 3 pode ver-se que as células THA fixadas com formaldeído e pré-incubadas com soro anti-T fixam um número significativo de bactérias, que não são arrastadas por processos de lavagem que as eliminam quase por completo das células pré-incubadas com soro normal de criceto

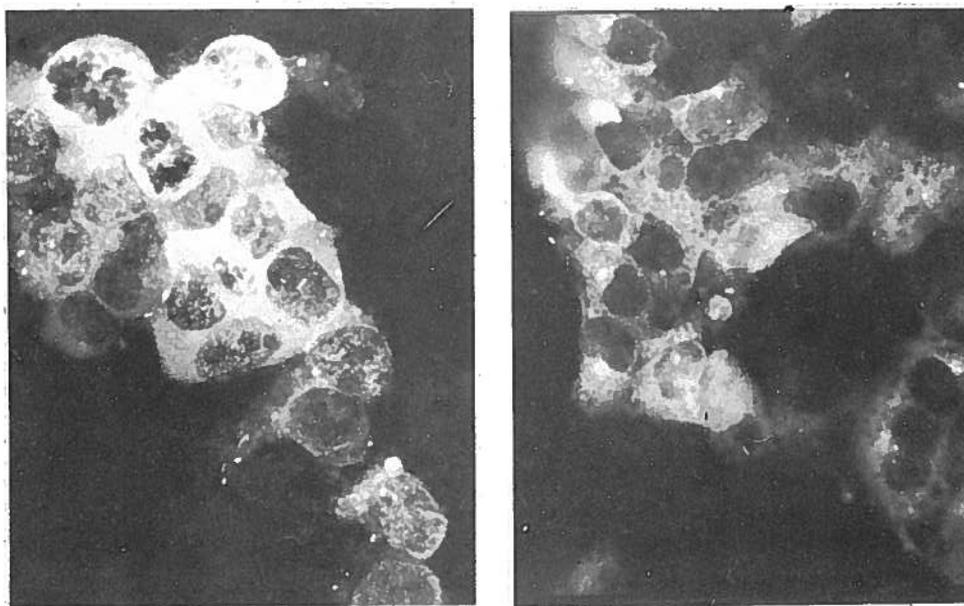


Fig. 1 — Imunofluorescência em células THA tratadas com soro anti-T. a) células fixadas com acetona; b) células fixadas com formaldeído. A barra indica 10  $\mu$ m.

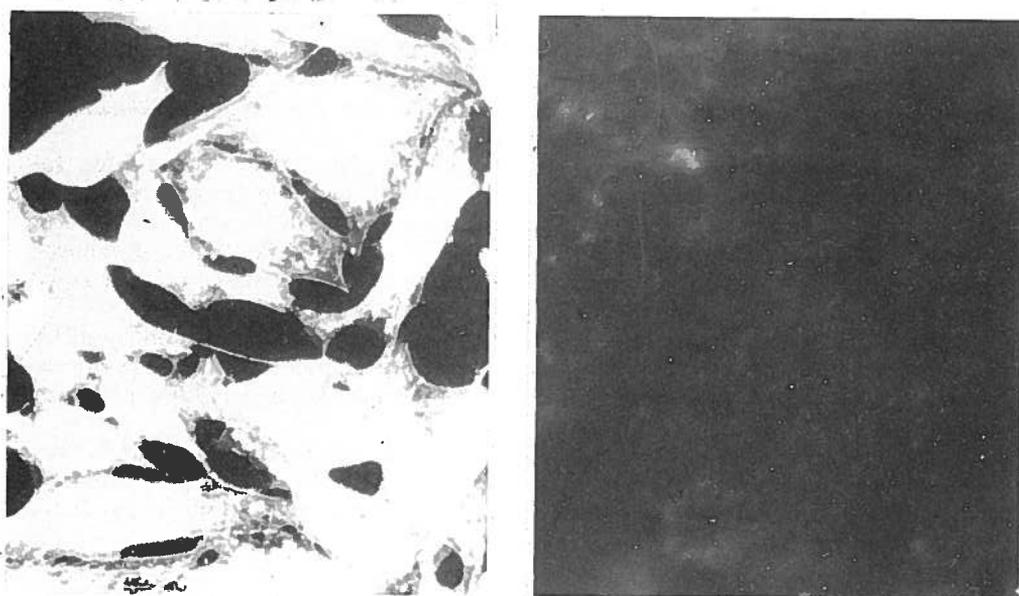


Fig. 2 — Imunofluorescência em células THA tratadas com soro anti-actina. a) células fixadas com acetona; b) células fixadas com formaldeído. A barra indica 10  $\mu$ m.

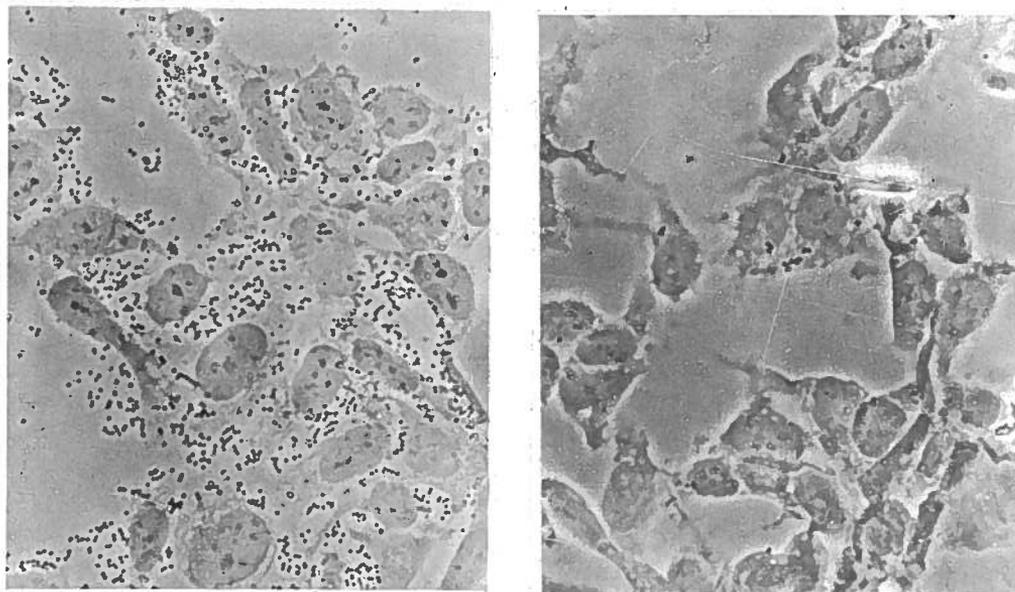


Fig. 3 — Ligação de *Staphylococcus aureus* a células THA fixadas com formaldeído e incubadas com (a) soro anti-T ou (b) soro normal de criceto. Observação em contraste de fase. A barra indica 10  $\mu$ m.

## DISCUSSÃO

Embora não se possa generalizar esta experiência a outros antígenos, este trabalho mostra que, pelo menos no caso do componente de membrana do antígeno T do Ad12, é possível evidenciá-lo por imunofluorescência em células fixadas com formaldeído, evitando-se assim o recurso à técnica de citotoxicidade com libertação de  $^{51}\text{Cr}$  até agora utilizada, <sup>7</sup> muito mais dispendiosa e envolvendo maiores dificuldades laboratoriais.

A imunofluorescência em células fixadas com formaldeído pode vir a demonstrar ser adequada para a evidênciação de outros antígenos de membrana, eventualmente com importância médica.

Não é seguro, porém, que esta técnica possa ter aplicação geral, sendo necessário experimentar caso a caso a sua utilidade. Com efeito, pelo menos no caso do antígeno T de membrana do SV40 só se consegue evidenciar determinantes antigénicos dependentes directamente da estrutura primária da proteína. <sup>6</sup>

Como os aldeídos induzem por esterificação a formação de pontes entre cadeias proteicas ou entre moléculas vizinhas, assim se explica, provavelmente, a sua acção impermeabilizadora da membrana em relação a macromoléculas, como os anticorpos. Por outro lado, podem impedir a visualização de antígenos, quer modificando a sua estrutura terciária ou quaternária quer mediante bloqueio estérico por ligação a outras proteínas.

A impermeabilidade das células fixadas com formaldeído foi confirmada pela não reactividade com soro anti-actina. Por outro lado, demonstrou-se a localização de membrana do componente do antígeno T evidenciado em células fixadas com formaldeído usando *S. aureus* como imuno-adsorvente. A dimensão da bactéria impede obviamente a sua ligação a imunocomplexos que não estejam localizados na superfície exterior da membrana celular.

A técnica utilizada é simples, económica, rápida e reprodutível. Convém no entanto chamar a atenção para alguns pormenores que, segundo a experiência do autor, são críticos.

Assim, é necessário utilizar formaldeído preparado de fresco por dissolução de paraformaldeído e nunca soluções comerciais de formaldeído, que contêm metanol e portanto permeabilizam as células. Paraformaldeído Serva ou TAAB são adequados a esta técnica, embora certos lotes contenham impurezas que resultam em ligeira permeabilização.

É também crítico que no decurso de todas as lavagens ou incubações nunca se deixe as células secarem.

A temperatura de fixação não parece crítica. Mautner e Hynes <sup>5</sup> usaram inicialmente a fixação à temperatura ambiente, durante 10-30 minutos. No caso das células THA esta fixação também permite a evidênciação do antígeno T de membrana, com impermeabilidade das células. No entanto, as células tendem a encolher e arredondar, tornando difícil a focagem da membrana e a observação e fotografia da imunofluorescência. A fixação mais prolongada mas a 0° C dá portanto melhores resultados, pelo menos com estas células.

*Agradecimentos*

O autor agradece à Dr.<sup>a</sup> Graça Ribeiro a sua valiosa participação no projecto e discussão deste trabalho, à Sr.<sup>a</sup> D. Júlia Lobato da Fonseca a sua dedicada colaboração técnica e à Sr.<sup>a</sup> D. Maria Manuela Magalhães a dactilografia do manuscrito.

## SUMMARY

FORMALDEHYDE FIXATION FOR SELECTIVE IMMUNOFLUORESCENCE  
OF MEMBRANE ANTIGENS

A membrane component of adenovirus type 12 T antigen can be observed by immunofluorescence on transformed cells fixed with formaldehyde. The membrane location of the antigen is confirmed by a *S. aureus* binding test. Intracellular T antigen is not observed in formaldehyde-fixed cells and the impermeability of formaldehyde-fixed cells is demonstrated by the nonreactivity of anti-actin serum.

## BIBLIOGRAFIA

1. IRLIN IS: Immunofluorescent demonstration of a specific surface antigen in cells infected or transformed by polyoma virus. *Virology* 1967; 32: 725.
2. KLUCHAREVA TE, SHACHANINA KL, BELOVA S, CHIBISOVA V, DEICHMAN GI: Use of immunofluorescence for detection of specific membrane antigen in simian virus 40 — infected nontransformed cells. *J. Nat Cancer Inst* 1967; 39: 825.
3. VASCONCELOS-COSTA J: Detection by immunofluorescence of surface antigens in cells from tumours induced in hamsters by adenovirus type 12. *J Gen Virol* 1970; 8: 69.
4. SANDERSON AR: Cytotoxic reactions of mouse iso-antisera: preliminary considerations. *Brit J Exp Pathol* 1964; 45: 398.
5. MAUTNER V, HYNES RO: Surface distribution of LETS protein in relation to the cytoskeleton of normal and transformed cells. *J Cell Biol* 1977; 75: 743.
6. DEPERT W, PATES R: Simian virus 40 specific proteins on surface of HeLa cells infected with adenovirus 2-SV40 hybrid virus Ad2\*ND2. *Nature* (London) 1979; 277: 322.
7. RASKA KJr, MORRONGIELLO MP, FÖHRING B: Adenovirus type 12 tumor antigen. III. Tumorigenicity and immune response to syngeneic rat cells transformed with virions and isolated transforming fragment of adenovirus 12 DNA. *Int J Cancer* 1980; 26: 79.
8. VASCONCELOS-COSTA J, RIBEIRO G: Adenovirus type 12 T — antigen — related surface antigen detected by immunofluorescence on the membrane of transformed and infected cells. *Virology*, no prelo.
9. KESSLER SW: Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A — antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J Immunol* 1975; 115: 1617.

Pedido de Separatas: *J. Vasconcelos-Costa*  
*Grupo de Virologia*  
*Instituto Gulbenkian de Ciências*  
*Apartado 14*  
*2781 Oeiras Codex*  
*Portugal*