

Purificación de mastocitos de fluido peritoneal de rata utilizando gradientes continuos de Ficoll

L. M. Botana, J. Espinosa y M.^a P. Fernández-Otero

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Farmacia
Santiago de Compostela (Spain)

(Recibido el 27 de abril de 1983)

L. M. BOTANA, J. ESPINOSA, M.^a P. FERNANDEZ-OTERO. *Use of a Continuous Ficoll Gradient for Mast Cell Purification from Rat Peritoneal Fluid*. Rev. esp. Fisiol., 39, 435-440, 1983.

A method for mast cells purification from rat peritoneal fluid is described. The method consists of a continuous Ficoll gradient between 20 and 22,5 % (w/v) Ficoll and the cells are obtained with an 88 % retrieval. Purity and viability were of 95 % and 97 % respectively. The cells so purified were functional against the compound 48/80 and the spontaneous secretion value was less than 8 %.

Los mastocitos son elementos sensores de respuesta inmediata en los procesos de defensa del organismo, que liberan su contenido en histamina como respuesta a una serie de estímulos específicos, mediados a través de la molécula de IgE. Se distribuyen por el tejido conectivo del organismo, aunque las preparaciones experimentales utilizan para su estudio casi exclusivamente células de las cavidades pleural y peritoneal, dado que tales cavidades constituyen una fuente aceptable para la obtención de preparaciones celulares puras.

La finalidad del estudio del mastocito obedece a dos criterios: el correspondiente a su función fisiológica y el hecho de que constituye un modelo sencillo para la investigación de los acontecimientos

celulares que conducen al proceso de secreción.

Debido a su importancia fisiológica se ha iniciado el estudio sistemático de los posibles receptores presentes en su superficie, aparte del ya estudiado para el IgE (3, 6). Para ello, se intentó obtener las preparaciones de mastocitos aplicando las técnicas habitualmente empleadas (2, 3, 14) sin obtener el rendimiento esperado. En consecuencia, se ha desarrollado un método modificado que constituye el objeto de este trabajo.

Material y métodos

Reactivos. O-ftalaldehído (OPT), albúmina sérica de bovino fracción V

(BSA), cloruro de histamina, compuesto 48/80, rojo de Rutenio y azul tripano proceden de Sigma (USA). El Ficoll 400 procede de Pharmacia. El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Determinación de histamina. Se utiliza básicamente el método de SHORE (12, 13) del modo y con las modificaciones que a continuación se describen. A una alícuota de 2 ml de solución de histamina se añaden 0,4 ml de NaOH 1 N, seguida de la adición de 0,1 ml de solución metélica de OPT al 0,2 %, con lo que no disminuye la fluorescencia de las muestras, pero sí la del blanco (1, 8). Esta mezcla de reacción se deja reposar 4 min, se añaden 0,2 ml de CIH 3 N y se realiza la lectura en un espectrofluorímetro Perkin Elmer, 204, excitando el fluoróforo a 360 nm y midiendo la fluorescencia a 450 nm. Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente y tras cada adición de reactivos el tubo se agita mecánicamente durante 10-15 segundos.

Los blancos de reacción fueron obtenidos invirtiendo el orden de adición de las soluciones de NaOH y CIH. Para cada experimento se incluyen calibrados que cubren el rango 0-500 ng/ml. Se logra una sensibilidad reproducible de 8 ng/ml y un error estándar del 3 % para el 95 % de confianza.

El proceso de extracción se omite tras haber sido comprobada la no existencia de fluoróforos interferentes en el fluido peritoneal. Sin embargo, fue necesaria la desproteinización de la muestra al observarse que la presencia de proteína incrementaba notablemente los valores de fluorescencia, realizándose la desproteinización con ácido tricloroacético al 7 %.

Purificación e incubación de mastocitos. Se utilizan las soluciones de lavado peritoneal (SLP) y de lavado de centrifugación (SLC) indicadas por UVNÁS (17), pero reduciendo la concentración de glucosa a 0,5 g/l.

Como medio de incubación se utiliza el Krebs-Ringer bicarbonato indicado por UMBREIT *et al.* (15), y de composición en Meq/l: 142 Na⁺; 5,9 K⁺; 5,1 Ca⁺⁺; 2,4 Mg⁺⁺; 129 Cl⁻; 22,8 CO₃H⁻; 1,2 PO₄ H₂⁻; 2,4 SO₄⁼. Se añade glucosa, 1 g/l, y albúmina (BSA), 1 g/l. Se burbujea con una mezcla de O₂ : CO₂ (95:5 %) y se ajusta el pH a 7,35 - 7,4 con bicarbonato sódico al 10 %.

Las soluciones SLP, SLC y el medio de incubación se filtran con filtros Millipore de 0,45 μ.

Acorde con el diseño experimental, el medio de incubación sufre modificaciones que se indican en las leyendas de las tablas y gráficas correspondientes.

Gradientes. Se utiliza un gradiente de proteína con BSA al 38 % en solución SLC exenta de proteína.

Las variantes de gradientes de Ficoll empleadas utilizan Ficoll 400 disuelto en solución salina tamponada a pH 7 (un volumen de tampón fosfato Sörensen más nueve volúmenes de solución salina). A la solución final se adicionan glucosa y BSA al 0,1 %. Las concentraciones de los diferentes tipos de gradientes se indican en el apartado de resultados y en las leyendas de las figuras correspondientes. La densidad de los gradientes se determina por gravimetría.

Pureza y viabilidad. El control de las fracciones de purificación se realiza mediante microscopía ordinaria y de contraste de fases. La tinción selectiva de mastocitos en el fluido peritoneal y en las fracciones de purificación se hace siguiendo el método de LAGUNOFF (9) ligeramente modificado. En el empleo inicial del método se observa una sobretinción de los mastocitos que impide visualizar su estructura granular, siendo necesaria una dilución: la solución colorante y fijadora (azul de toluidina 0,5 g; formalina, 80 ml; ácido acético glacial, 20 ml) se diluye en proporción 1:2 en solución salina. Se rea-

liza la tinción con 10 μ l de esta dilución para 100 μ l de suspensión celular. Tras 2-5 min de espera, se observa al microscopio.

Como test de viabilidad se utilizan los de exclusión de azul tripano (10) y rojo de Rutenio (11). Los recuentos se hacen en cámara de Thoma.

Aislamiento y purificación. En cada experimento se utilizan 10 ratas tipo Wistar machos y hembras, alimentadas *ad libitum* y de peso 250-350 g. Tras anestesia con éter se decapitan y desangran, se expone la musculatura abdominal y se practica una pequeña abertura en la línea media, a través de la cual se introducen en la cavidad abdominal 10 ml de SLP. Se pinza el orificio y tras suaves y continuos masajes durante 3 min, se recoge el fluido abdominal con una pipeta Pasteur de plástico y se deposita en un tubo que se centrifuga a 50 $g_{\text{máx}}$ durante 5 min. El sedimento se resuspende en un volumen de 4 ml de SLC y se deposita cuidadosamente sobre el gradiente del sistema de purificación (Ficoll o proteína). Cada purificación incluye dos tubos, uno para cada cinco ratas, que se centrifuran en rotor basculante a 530 $g_{\text{máx}}$ durante 20 minutos.

Tras la centrifugación se aspiran las distintas bandas obtenidas y se lavan con 10 ml de SLC, centrifugando a 80 $g_{\text{máx}}$ durante 10 min. Este proceso se repite 3 veces. A continuación se procede a su examen, resuspendiendo los sedimentos en 2 ml de Umbreit.

Incubación. Alícuotas con un contenido prefijado y constante de mastocitos de 10^5 células se incuban en medio Umbreit a 37°C y con agitación orbital (160 ciclos/min), en un volumen final de 1 ml. Se gasea cada tubo durante 10-15 s (95 % O_2 ; 5 % CO_2) y se preincuban durante 10 min, seguido de la adición del tratamiento correspondiente e incubación durante 20 min. Se detiene el proceso por inmersión

de los tubos en hielo durante 10 min y a continuación se centrifugan a 1.080 $g_{\text{máx}}$ durante 10 min. Previa desproteínización, se determina la histamina del sobrenadante y la retenida en el sedimento, una vez resuspendido y sometido a ebullición (10 min).

La secreción de histamina se expresa como porcentaje del total disponible para la secreción, teniendo en cuenta la liberación espontánea. Para ello, en todos los procesos de incubación se introducen tubos suficientes para calcular la liberación espontánea. Tales tubos no llevan tratamiento, sino únicamente las células y el medio de incubación.

La histamina total añadida se determina mediante ebullición, durante 10 min, de alícuotas semejantes de células en 1 ml de agua destilada.

Análisis de los métodos de separación. Para cada método de separación se identifican las zonas de ubicación de los mastocitos, así como la localización de linfocitos, macrófagos y, en su caso, eritrocitos. En las fracciones de mastocitos recogidas, se estudian los siguientes parámetros: pureza, viabilidad, porcentaje de recuperación, secreción espontánea y número de mastocitos por mililitro (después de lavar la fracción y resuspender en 2 ml). La secreción espontánea se determina en ausencia de tratamiento y según se indica en el epígrafe referente a incubación.

Cálculo del porcentaje de secreción de histamina. El porcentaje de respuesta se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Respuesta (\%)} = \frac{L - Le}{(L - Le) \times R} \times 100$$

donde L es la histamina medida en el sobrenadante de los tubos a los que se aplica tratamiento, Le es la histamina medida en el sobrenadante de los tubos de control de liberación espontánea y R es la histamina

residual del sedimento. El porcentaje de liberación espontánea se calcula a partir de los tubos control mediante simplificación de la fórmula anterior:

$$\text{Liberación espontánea (\%)} = \frac{Le}{Le + R} \times 100$$

Resultados y discusión

Porcentaje de mastocitos en el fluido peritoneal. En todos los experimentos, y antes de proceder a la purificación, se determina el porcentaje de mastocitos en el fluido peritoneal, encontrándose un valor de $4,1 \pm 1,5 \%$ ($n = 54$).

Rendimiento de los métodos de separación. En la tabla I se indican los resultados obtenidos para los cinco métodos de separación estudiados. Se comprueba que los gradientes recomendados en la bibliografía, -38 % de BSA (14), 35 % de Ficoll (3) y 30/40 % de Ficoll (2), no proporcionan recuperaciones aceptables de mastocitos, aunque los parámetros de pureza, viabilidad y secreción espontánea son válidos.

En el caso de los gradientes de proteína (38 %) y de Ficoll (35 %), se obtiene un porcentaje de recuperación bajo, incrementándose ligeramente con el gradiente discontinuo de Ficoll (30/40 %), con el cual se obtienen los mastocitos en la interfase de ambas concentraciones, mientras que con el de BSA y el de Ficoll (35 %) las células llegan hasta el fondo del tubo.

Dado que se desconocía qué densidad discriminaba y a la vez retenía a los mastocitos, se utilizan gradientes discontinuos de Ficoll con un bandeado que oscila entre 15 y 30 %, con intervalos del 5 % entre cada banda. Los primeros resultados indican que las altas densidades de Ficoll impiden el paso de los mastocitos y no los discrimina de otras células presen-

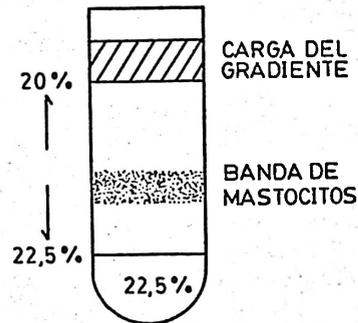


Fig. 1. Esquema del gradiente de Ficoll definitivo utilizado en la purificación de mastocitos.

tes en el fluido peritoneal (linfocitos, macrófagos y ocasionalmente eritrocitos).

Se observa que la primera capa que retiene a los mastocitos es la del 25 %. En consecuencia, se diseñan experimentos con bandas entre 20 y 25 %, comprobándose que la mínima concentración límite que retiene a los mastocitos es la de 22,5 %; además, la banda del 20 % retiene bien los contaminantes celulares de la preparación (linfocitos, macrófagos y eritrocitos). Por tanto, se utilizan finalmente bandeos discontinuos del 20/22,5 % y un gradiente continuo entre el 20 y el 22,5 % sobre un cojín del 22,5 %. Los mastocitos se detienen ya discriminados en la interfase 20/22,5 % (caso del gradiente discontinuo) o en la zona media del gradiente continuo que corresponde a un margen de densidades de $1,07-1,08 \text{ g/cm}^3$ (fig. 1).

Funcionalidad de los mastocitos. Dado que la respuesta del mastocito frente al compuesto 48/80 está tipificada, se ha utilizado para analizar el estado funcional de los mastocitos purificados. El estudio se realiza en presencia y en ausencia de iones calcio, y utilizando mastocitos purificados con el gradiente tipo V (tabla I). Las células reproducen el comportamiento dosis-respuesta frente al compuesto 48/80 tanto en presencia como en ausencia de iones calcio. Conserván-

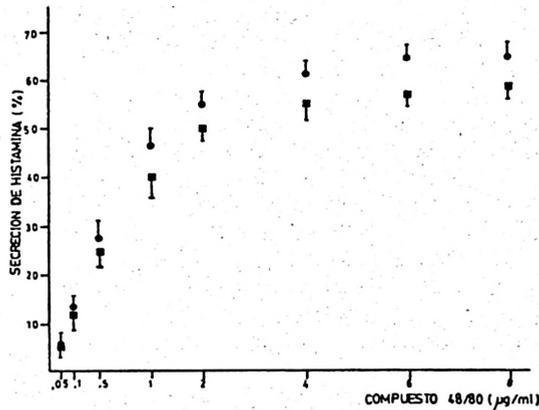


Fig. 2. Respuesta de los mastocitos al tratamiento con compuesto 48/80 en presencia (●), y en ausencia (■) de iones calcio.

En ambos casos se indica la $\bar{x} \pm \text{SEM}$ para $n = 6$.

do se el perfil de respuesta, para cada concentración de 48/80 la secreción de histamina es ligeramente inferior en ausencia de iones calcio (fig. 2).

Los resultados expuestos en la tabla I argumentan a favor de la utilización de los gradientes IV y V dado que proporcionan mayor rendimiento de células, manteniéndose la viabilidad, pureza y secreción espontánea que se alcanza con los otros métodos ensayados, aunque el rendimiento del gradiente tipo V es ligeramente superior, por lo cual se aconseja su uso. En este sentido, se indica a continua-

ción la construcción del mismo: se dispone en el fondo del tubo 2 ml de Ficoll al 22,5 %, seguida de la adición muy suave y contra las paredes del tubo de 5 ml de gradiente continuo 20-22,5 obtenido con un generador de gradientes. La carga del gradiente es de 4 ml de suspensión celular.

El método de purificación que aquí se propone no descalifica a los otros métodos que se intentaron reproducir sin éxito. Se sabe que la población de mastocitos de peritoneo de rata tiene un recambio lento, aumentando su número y tamaño con la edad del animal (7), así como la densidad media de las células. Puesto que las densidades que tienen los gradientes I, II y III son superiores a las aquí utilizadas, su rendimiento aumentará proporcionalmente con la edad del animal.

Finalmente, la curva dosis-respuesta obtenida frente a 48/80, pero en ausencia de iones calcio, es explicable dado que se ha comprobado, en experiencias agrupadas, que el compuesto 48/80 no necesita de la presencia de iones calcio externos para provocar la secreción de histamina (16).

Resumen

Se describe un método de purificación de mastocitos de peritoneo de rata utilizando un gradiente

Tabla I. Recuperación, pureza, viabilidad y secreción espontánea de los mastocitos obtenidos con los cinco tipos de gradientes que se han utilizado para su purificación

Los valores obtenidos para cada tipo de gradiente se expresan como $\bar{x} \pm \text{CV} \%$, se indica además el número de veces que se repitió cada gradiente. La composición de cada gradiente es la siguiente: Tipo I (38 % BSA), Tipo II (Ficoll 35 %), Tipo III (Ficoll 30/40 %), Tipo IV (Ficoll 20/22,5 %) y Tipo V (Ficoll 20-22,5/22,5 %).

Tipo de gradiente	Mastocitos/ml	Pureza (%)	N	Recuperación (%)	Viabilidad (%)	Secreción espontánea (%)
I	$0,7 \times 10^4 \pm 16$	100	4	9 ± 12	96 ± 12	7 ± 15
II	$0,9 \times 10^4 \pm 15$	98 ± 2	4	12 ± 8	97 ± 3	8 ± 14
III	$1,1 \times 10^4 \pm 15$	98 ± 2	5	15 ± 8	95 ± 3	6 ± 13
IV	$6,0 \times 10^4 \pm 13$	96 ± 3	7	80 ± 4	96 ± 3	$7,5 \pm 14$
V	$6,5 \times 10^4 \pm 12$	95 ± 3	7	88 ± 5	97 ± 2	$6,4 \pm 15$

continuo de Ficoll (20-22,5 %). Se logra una recuperación del 88 %, siendo la pureza del 95 % y la viabilidad del 97 %. Los mastocitos así purificados se muestran funcionales frente al compuesto 48/80 y su secreción espontánea no supera el 8 %.

Bibliografía

1. ATACK, C.: *Acta Physiol. Scand.*, Suppl. 451, 28-38, 1976.
2. BLANDINA, P., FANTOZZI, R., MANNAIONI, P. F. y MASINI, E.: *J. Physiol.*, 301, 281-293, 1980.
3. CONRAD, D. H., BAZIN, H., SEHAN, A. H., FROESE, A.: *J. Immunol.*, 114, 1688-1691, 1975.
4. CONRAD, D. H., FROESE, A.: *J. Immunol.*, 116, 319-326, 1976.
5. FOREMAN, J. C.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21, 63-81, 1981.
6. FOREMAN, J. C.: En «Towards Understanding Receptors» (Lamble, J. W., ed.), Elsevier North-Holland Inc., Nueva York, 1981, pp. 217-222.
7. GORAN, K., LAGUNOFF, D.: *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.*, 65, 291-299, 1981.
8. HAKANSON, R., RONBERG, A. L., SJOLUND, K.: *Anal. Biochem.*, 47, 356-370, 1972.
9. LAGUNOFF, D.: En «Techniques of Biochemical and Biophysical Morphology» (Glick, D., Rosenbaum, R., ed.), Wiley Interscience, Chichester, 1975, Vol. 2, p. 291.
10. MISHALL, B. B., SHIGI, S. M.: En «Selected Methods in cellular Immunology», W. H. Freeman, and Co., Folkestone, 1980, pp. 16-17.
11. NEMETH, A., ROHLICH, P.: *Eur. J. Cell. Biol.*, 20, 272-275, 1980.
12. SHORE, P. A.: *Meth. Enz.*, 17, 842-845, 1971.
13. SHORE, P. A., BURTKHALTER, A., COHN, V.: *J. Pharmacol.*, 127, 182-186, 1959.
14. SULLIVAN, T. J., PARKER, K. L., EISEN, S. A., PARKER, Ch. W.: *J. Immunol.*, 114, 1480-1485, 1975.
15. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., STANFFER, I. F.: En «Manometric Techniques» (5.ª ed.), Burgers Publ. Co., Minneapolis, 1972.
16. UVNÄS, B.: En «Molecular and Biological aspects of acute allergic reactions», Noble Foundation Symposium, Plenum Press, Nueva York, 1976, pp. 217-227.
17. UVNÄS, B.: *Meth. Enz.*, 31, 395-402, 1979.