

Valoración de una técnica de aislamiento de células mamotropas utilizando dopamina como ligando

L. Jiménez-Reina, J. García-García y G. Bernal-Valls *

Cátedra de Anatomía Humana
Facultad de Medicina
Córdoba (España)

(Recibido el 15 de junio de 1985)

L. JIMENEZ-REINA, J. GARCIA-GARCIA and G. BERNAL-VALLS. *Evaluation of an Isolating Technique of Mammothroph Cells with Dopamine as Ligand*. Rev. esp. Fisiol., 42 (3), 329-334, 1986.

Pituitary cell suspension from female Wistar rats were allowed to enter the 6MB sepharose gel with added dopamine, which acts ligand attaching the mammothrophs to the gel grains. After eluting the column with 3 different dopamine buffer concentration, 3 different cellular fractions were obtained. Fraction F₁ contains 5 % of mammothroph cells, fraction F₂ 2-4 % and fraction F₃ 90 %, as determined by immunocytochemistry. The absolute amount of mammothroph cells contained in F₃ fraction increases by gradually warming up the column from room temperature to 37°C. The eluted F₃ fraction mammothroph cells from female lactating rats is observed to be twice the amount eluted in experiments performed with virgin rats. No ultrastructural differences between fraction F₁ and fraction F₃ mammothroph cells have been found.

Key words: Mammothroph cells, Dopamine.

Mediante técnicas de afinidad cromatográfica se han separado células neurales de distinta categoría (1, 5), así como células gonadotropas adenohipofisarias (14). Más o menos arraigado el concepto de especificidad celular y funcional de las células adenohipofisarias, se han publicado varios trabajos (4, 9, 10) sobre técnicas de sedimentación por unidad de gravimetría y centrifugación por gradiente de densidad, para el aislamiento de distintos tipos celulares. Recientemente (3) se ha utilizado dopamina acoplada a un gel de Sepharosa que, al actuar como li-

gando de las células mamotropas, consigue su aislamiento por afinidad cromatográfica.

En el presente trabajo se hace una valoración de esta técnica estudiando la cuantificación de cada fracción celular a temperaturas distintas, la confirmación inmunocitoquímica de las células mamotropas de cada fracción y sus características ultraestructurales tras el aislamiento.

Material y Métodos

Para la dispersión celular adenohipofisaria se utilizan ratas Wistar, lactantes y vírgenes, de unos 250 g de peso. Tras de-

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

capitación, se extraen las adenohipófisis y se sumergen en una solución tampón (18), se trocean y se incuban con tripsina al 9,2 %, durante 45 min a 37°C en agitación continua. Se añade desoxirribonucleasa (4 µg/ml) durante 15 min más y se completa la dispersión mecánicamente. La suspensión se filtra en una malla de poros de 105 µ de diámetro y se lava dos veces con tampón. Previo conteo y test de viabilidad, se incuba toda la noche en MEM al que se añade suero de rata al 10 %, 100 UI/ml de penicilina, 30 µg/ml de estreptomycin y 50 U/ml de nistatina.

Para la afinidad cromatográfica se utilizan 0,5 g de CNBr-Sepharosa 6MB. Se lava con ClH 1 mM y un tampón para el acoplamiento y se añade al gel dopamina al 2 %; se somete a agitación continua durante 2 h y se lava tres veces con el tampón de acoplamiento y con el de acetato (3).

El gel absorbente se coloca en una jeringa de 5 ml sobre una malla de 105 µ de diámetro y sobre él se depositan unas 15×10^6 células en 1 ml de buffer de separación, procediendo a incubar durante 15 min a diferentes temperaturas (22, 28 y 37°C). Sobre el gel, y a un flujo de 3 ml/min, se hacen tres eluciones sucesivas: con una solución de separación, con dopamina 50 µmoles y con dopamina 5 nmoles. En cada una de las tres fracciones celulares obtenidas se efectúa un test de viabilidad con azul tripán.

Para la identificación inmunocitoquímica de las células mamotropas se procede al lavado de cada suspensión con PBS y fijación con glutaraldehído al 1 % durante 15 min. Después de tres lavados con PBS + Tritón X-100 al 0,1 % se incuban, durante 20 h a 4°C, con suero de conejo antriplactina de rata (1:10.000); a temperatura ambiente se hacen dos incubaciones de una hora cada una, con IgC anticonejo de cabra (1:25) y con complejo peroxidasa-antiperoxidasa (1:100), respectivamente. El revelado se realiza con diaminobencidina y agua oxigenada durante 1,5 min (7). En cada fracción se hace un conteo de 100 células para cuantificar el número de células «teñidas».

El estudio ultraestructural se realiza mediante las técnicas habituales utilizando la resina Spurr (17). Los cortes ultrafinos se tiñen mediante la doble coloración de Reynolds.

Resultados

En ratas vírgenes, las separaciones de las células al gel adsorbente dan lugar a tres fracciones celulares (F_1 , F_2 , F_3) en proporciones diferentes, según sea la temperatura a que se haya realizado el experimento (tabla I), observándose un mayor acoplamiento a la dopamina en la fracción 3 y a mayor temperatura. En todos los casos, con una viabilidad celular del 90-92 %, el porcentaje de células inmunocitoquímicamente positivas a la prolactina es del 90 % en la fracción 3 (tabla I), cuyo aspecto se ofrece en la figura 1b. Por el contrario, son escasas tanto en proporción (tabla I) como en intensidad reactiva (fig. 1a) las células de las otras dos fracciones.

Con relación a la proporcionalidad existente entre la fracción 3 y las fracciones 1 y 2 (tabla II) se observa una disminución progresiva a medida que la temperatura de incubación es mayor.

Tabla I. Fracciones celulares adenohipofisarias (%) obtenidas a distinta temperatura y porcentaje de células inmunocitoquímicamente PRL positivas de cada fracción.

Fracción	22°C	28°C	37°C	% + ICC
F_1	83,0	69	64,5	5,0
F_2	2,5	7	5,5	2,4
F_3	14,5	24	30,0	90

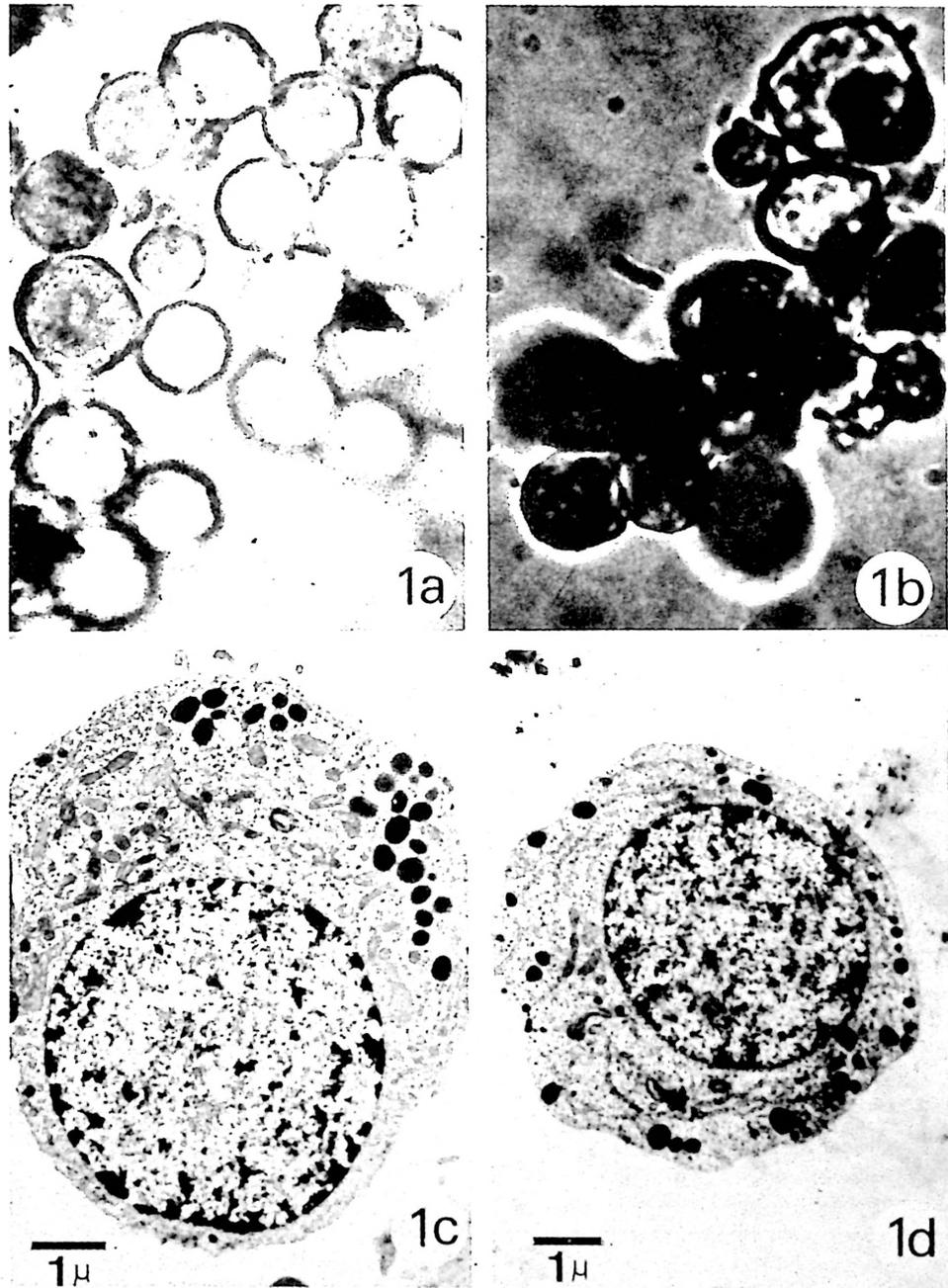


Fig. 1. Células adenohipofisarias aisladas por afinidad cromatográfica. Tinción inmunocitoquímica para PRL. Células negativas (1a) de la fracción primera. Células intensamente positivas (1b) de la fracción tercera. Aumentos del negativo: 250X. Aspecto ultraestructural de las células prolactínicas de las fracciones primera (1c) y tercera (1d). Obsérvese la similitud entre ambas.

Tabla II. Proporcionalidad de células de la fracción 3 con relación a la suma de las fracciones 1 y 2.

Temperatura °C	$F_3/F_1 + F_2$
22	1 : 5,9
28	1 : 3,1
37	1 : 2,3

En las ratas lactantes, lo más destacado es la comparación de la proporción celular de cada una de las fracciones, entre ellas y las de ratas vírgenes (tabla III). Se muestra un marcado incremento de células prolactín-positivas en la fracción tercera, equivalente al descenso proporcional en la fracción primera, sin apenas alteración en la fracción segunda, y todo ello a temperatura ambiente (22°C).

El estudio ultraestructural de las células mamotropas no presenta características diferentes (fig. 1, c y d). Tanto las células de la F_1 (1c) como de la F_3 (1d) tienen un aspecto similar. Por su morfología granular y reticular corresponden a las células que ultraestructuralmente se catalogan como mamotropas. Los granos de secreción son escasos, densos y de localización periférica; el retículo es de largas láminas, apretadas y paralelas; abundantes mitocondrias, algunas de gran tamaño y gran cantidad de ribosomas, lo que da un aspecto general de células de citoplasma

Tabla III. Porcentaje de células adenohipofisarias en cada una de las fracciones en ratas vírgenes y madres lactantes.

Fracción	Ratas vírgenes	Ratas lactantes
F_1	83,0	63
F_2	2,5	2
F_3	14,5	35

oscuro. Todos estos datos inducen a pensar se trata de células prolactínicas inactivadas o inhibidas por la acción de la dopamina.

Discusión

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se desprende una valoración positiva de la técnica de aislamiento de las células mamotropas, utilizando como ligando la dopamina acoplada a un gel de sepharosa (3). Se constata que, además de ser de fácil realización por el tiempo no superior a una hora en su desarrollo, no altera la viabilidad celular, como se demuestra por la obtención del 90 % de células viables. Este hecho marca una importante diferencia con las técnicas de centrifugación por gradiente de densidad (9) y de su sedimentación por unidad de gravimetría (10), que necesitan de unas cinco horas para su realización y cuyo porcentaje de muerte celular alcanza el 25 %.

Las tres fracciones son de fácil obtención y manejo y, al recogerse independientemente, se evita la «contaminación» o bandas de fracciones celulares de muy diferentes tipos celulares.

La fracción tercera contiene la casi totalidad de células mamotropas y también algunas células somatotropas, lo que puede explicarse por la existencia en estas últimas de receptores dopaminérgicos (6). Mientras que con esta técnica el 90 % de las células de la fracción tercera son inmunocitoquímicamente prolactín-positivas, por centrifugación por gradiente de densidad, sólo se consigue aislar el 70 % (11) y siempre que se obtengan de ratas hembras lactantes a las que 24 h antes se separan de las crías (11).

El hecho de aumentar el porcentaje de las células aisladas a mayor temperatura, es lógico pensar se deba a una mayor facilidad de acoplamiento a la dopamina a 37°C.

La existencia de un mayor número de células mamotropas, especialmente en la fracción tercera, en ratas lactantes, apoya la tesis de aumento paralelo del número de células prolactínicas y de su contenido hormonal en estas situaciones (16).

Uno de los datos sometidos a mayor controversia y que requiere estudios posteriores, es el referido al conjunto de células prolactín-positivas en la fracción primera (5 %). Para algunos autores (2, 13) se trataría de células que no han recuperado sus receptores específicos tras el tratamiento enzimático; para otros (12), serían células cuyo estado funcional les hace comportar de forma distinta. Con respecto a la segunda hipótesis, el análisis ultraestructural de las células obtenidas en las fracciones primera y tercera, muestra dos hechos a destacar. Por un lado, la no existencia de diferencias ultraestructurales entre las células absorbidas y retenidas en el gel y posteriormente recogidas en la fracción tercera (prolactínicas) y las no retenidas por el gel (prolactínicas de la fracción primera); por otro, las características, comunes a ambas, de inhibición por la actuación de dopamina. En suma, parece desprenderse que, aun cuando la dopamina ha ejercido un efecto inhibitorio sobre las células prolactínicas, ésta no ha sido captada por sus receptores en la fracción primera.

Resumen

Se describe una técnica de aislamiento de células mamotropas. Células adenohipofisarias dispersas de ratas hembras Wistar se colocan en una columna de Sepharosa 6MB, a la que se acopla dopamina. La dopamina actúa como ligando de las células mamotropas a los granos del gel. Con tres eluyentes de distinta concentración de dopamina, se obtienen 3 fracciones celulares. Determinando por inmunocitoquímica, la fracción F₁ contiene un 5 % de células mamotropas, la fracción F₂, 2-4 % y la fracción F₃, 90 %. El número de células en la fracción F₃ aumenta a medida que aumenta la temperatura de la columna, desde temperatura ambiente a 37°C. El

número de células mamotropas en la fracción F₃ de ratas lactantes es doble del número de células de la misma fracción de ratas vírgenes. No se aprecian signos ultraestructurales diferentes entre las células mamotropas de las fracciones F₁ y F₃.

Bibliografía

1. Au, A. M. y Varón, S.: *Expl. Cell. Res.*, **120**, 269-276, 1979.
2. Ben-Jonhatan, N.: *J. Reprod. Fert.*, **58**, 501-512, 1980.
3. Bilinski, M. y Tramezzani, J.: *Acta Phys. Lat.*, **30**, 53-55, 1983.
4. Deneff, C., Hautekeete, E., De Wolf, A. y Vander Schueren, B.: *Endocrinology*, **103**, 724-735, 1978.
5. Dvorak, D. J., Gipps, E. y Kidson, C.: *Nature*, **271**, 564-566, 1978.
6. Goldsmith, P. C., Cronin, M. J. y Weiner, R. I.: *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1205-1207, 1979.
7. Graham, R. C. Jr. y Karnosky, M. J.: *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 291-302, 1966.
8. Gudelsky, G. A., Nansel, D. D. y Porter, J. C.: *Endocrinology*, **107**, 30-34, 1980.
9. Hymer, W. C., Kraicer, J., Bencosme, S. y Haskill, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **141**, 966-973, 1972.
10. Hymer, W. C., Evans, M., Kraicer, J., Mastro, A., Davis, J. y Griswold, E.: *Endocrinology*, **92**, 275-286, 1973.
11. Hymer, W. C., Snyder, J., Wilfinger, W., Swason, N. y Davis, J.: *Endocrinology*, **95**, 107-122, 1974.
12. Hymer, W. C.: En «Ultrastructure in biological system» (Tixier-Vidal, A. y Farquhar, M. G., eds.). Academic Press. Londres, vol. 7, pp. 137-180, 1975.
13. Hopkins, C. R. y Farquhar, M. G.: *J. Cell. Biol.*, **59**, 276-308, 1973.
14. Ishikawa, H., Shiino, M. y Rennels, E. G.: *Cell. Tiss. Res.*, **189**, 31-40, 1978.
15. Nansel, D. D., Gudelsky, G. A. y Porter, J. C.: *Endocrinology*, **105**, 1073-1077, 1979.
16. Neill, J. D.: En «Handbook of Physiology». Sec. 7: Endocrinology (R. O. Greep y C. B. Astwood, eds.). Am. Physiol. Soc. Washington, D.C. 1974, vol. 4, pp. 469-488.
17. Spurr, A. R.: *Ultrast. Res.*, **26**, 31-43, 1969.
18. Vale, W., Grant, G., Amoss, M., Blanckwell, R. y Guillemin, R.: *Endocrinology*, **91**, 562-572, 1972.

