

Estimulación de colonias de células de riñón de trucha con fitohemaglutinina en cultivos de fibrina

J. Coll Morales

Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Centro de Investigación y Tecnología.
Departamento de Sanidad Animal. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

Las células de riñón de trucha, el órgano hematopoyético más importante, son capaces de proliferar formando colonias en coágulos de fibrina dependiendo de la presencia de fitohemaglutinina (mitógeno específico de los linfocitos T de mamíferos). La fitohemaglutinina estimulaba la formación de colonias de linfocitos, células con núcleo excéntrico, polimorfonucleares y células con núcleo grande. La heterogeneidad de esta respuesta celular sugiere que en este animal primitivo las reacciones inmunológicas pueden ser más sencillas que en los mamíferos ya que un solo estímulo mitogénico da lugar a la proliferación de diversos tipos celulares. Este método puede aplicarse al estudio de la respuesta inmune en el caso de infecciones víricas o bacterianas *in vitro*, tanto de la trucha como de otros animales más evolucionados entre los que podemos incluir al hombre.

Induction of colony formation by phytohemagglutinin stimulation of rainbow trout kidney in fibrin cultures

The cells from rainbow trout kidney, its main hematopoietic organ, are able to proliferate by forming colonies in fibrin-clots in the presence of phytohemagglutinin (a mitogen of mammalian T lymphocytes). The addition of phytohemagglutinin induced colonies formed by lymphocytes, eccentric-nuclei cells, multinucleated cells and large nucleated cells. The heterogeneity of this response suggests that, in this primitive animal the immunological reactions could be simpler than in mammals, one unique mitogen giving rise to proliferation of more than one cellular type. This method could be applied to the study of the immune response in the case of viral or bacterial infections, in trouts as well as in other animals including men.

INTRODUCCIÓN

Los peces pertenecen al grupo de los animales más primitivos capaces de poseer un sistema inmune adaptativo caracterizado por la existencia de linfocitos (no se sabe si existen linfocitos B y T) e inmunoglobulinas solamente de la clase IgM¹.

Correspondencia y solicitud de separatas: Dr. Julio Coll Morales.
Departamento de Sanidad Animal. INIA-CIT. Embajadores, 68.
28012 Madrid.

Por lo tanto es de interés estudiar cómo funciona este sistema inmune, no sólo desde el punto de vista práctico del desarrollo de vacunas para acuicultura, sino también como un modelo más sencillo para entender las respuestas inmunológicas a las infecciones. Uno de los interrogantes planteados es si este modelo requiere los tipos celulares y las interacciones típicas de la inmunología más compleja de los mamíferos^{2,3}.

El cultivo en medio líquido se ha usado generalmente⁴ para el estudio de las respuestas proliferativas (medidas por incorporación de timidina tritiada) de los linfocitos de trucha a los mitógenos de las células T o B de mamíferos^{5,6}. Estos trabajos han tenido como objetivo prioritario tratar de demostrar la existencia de heterogeneidad B/T entre los linfocitos de peces. Sin embargo, estos estudios no han llegado todavía a conclusiones definitivas, en cuanto a la heterogeneidad funcional se refiere, debido a la falta de reproducibilidad de resultados entre los grupos de investigadores y a la falta de una definición morfológica de los tipos celulares implicados en dichas respuestas.

El uso de coágulos de fibrina como medio semisólido, aunque descrito con anterioridad^{7,8}, es la primera vez que se aplica a las células hematopoyéticas de trucha. Tiene todas las ventajas del clonaje en medio semisólido y evita tanto la toxicidad a las células como la exposición a temperaturas demasiado elevadas que pueden encontrarse al utilizar el agar. Además, la utilización de esta técnica permite conservar los resultados, poder comparar directamente experimentos diferentes y usar métodos de inmunodetección. El clonaje en fibrina podría aplicarse al estudio de los linfocitos en mamíferos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos y reactivos

El medio de cultivo utilizado fue el RPMI-1640 (modificado por Dutch) de Flow Lab. (Ayrshire, Escocia) de alta osmolaridad (312 mOsm). El fibrinógeno (A.B. Kabi, Estocolmo, Suecia) se reconstituyó, se dializó varias veces y se liofilizó en alícuotas que se guardaron a -20° C hasta su uso. Otros componentes utilizados como la gentamicina (Schering Corp. Kenilworth, NJ), la anfotericina (Flow Lab.), la trombina (Miles Lab, Elkhart, Indiana) y la fitohemaglutinina (PHA) (Flow Lab.), se alícuotaron y se guardaron a -20° C hasta su uso.

Obtención de células de riñón de trucha

Las truchas se obtuvieron de granjas comerciales con 5-20 g de peso, después de que varios análisis anuales indicaran que estaban libres del virus de la necrosis pancreática infecciosa⁹. Las truchas se mantuvieron en acuarios de 30 litros con agua de clorinada a 12-18° C hasta su uso. Antes de utilizarlas se enfriaron a 4° C y se sangraron totalmente por la vena de la aleta caudal para reducir el contenido de células rojas del riñón. Una vez sangradas, el riñón anterior (pronefros) se diseccionó en condiciones estériles y se cortó con tijeras en una placa de Petri. Los grupos de células se disociaron pasando repetidamente la suspensión celular a través de una aguja de 20 gauges. La suspensión celular en medio de cultivo se decantó brevemente, se centrifugó a 1.000 g durante 10 minutos y se lavó dos veces en medio de cultivo enfriado. La concentración celular se determinó con un hemocitómetro y se ajustó a 200.000 células redondeadas por ml de medio de cultivo. Los eritrocitos maduros, identificados por su morfología ovoide no se incluyeron en las cuentas (contaminación menor de un 10 % de las células totales). La viabilidad celular, estimada por exclusión del azul de triptano al 1 % fue siempre mayor del 80 %.

Cultivo celular en coágulos de fibrina

El medio de cultivo celular fue el RPMI-1640 (modificado por Dutch) con 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato sódico, 1,2 µg/ml anfotericina, 50 µg/ml gentamicina, 20 mM Hepes, 50 µM betamercaptoetanol, 10 % de suero de ternera fetal (pretestado para el crecimiento de colonias de células de riñón de trucha) y 0,5 % de suero de trucha (mezclado de varias truchas sanas). El fibrinógeno se añadió al medio inmediatamente antes del uso a una concentración final de 0,2 mg/ml. La trombina se añadió a los pocillos de las placas de 96 pocillos (Costar, Holanda) inmediatamente antes de añadir el medio completo con fibrinógeno y con las células de riñón de trucha, a una concentración final de 2-4 unidades NIH/ml.

Los cultivos de células de riñón de trucha fueron siempre a partir de animales individuales para evitar cualquier posible reacción entre los linfocitos de diferentes individuos¹⁰. La suspensión celular se preparó, la trombina se añadió a 0,2-0,4 unidades NIH/pocillo en 2 µl de volumen y 100 µl de la suspensión celular se pipetearon en cada pocillo. Después de la coagulación en unos 30 segundos, la fitohemaglutinina disuelta en agua destilada-estéril se añadió en un volumen máximo de 5 µl por pocillo. Las placas se sellaron después en bolsas de plástico de 20 x 12 cm (Vaessen, Schoemaker Indtal, S.A., Sant Boi de Llobregat, Barcelona, España), se gasearon con 5 % de CO₂ en aire, se sellaron con cinta adhesiva y se incubaron a 20 °C durante 2 semanas. Después de la incubación, los coágulos de fibrina se deslizaron de los pocillos a los portas de microscopio con una espátula. Los coágulos se deshidrataron parcialmente colocándoles encima papel Whatman n.º 1. Después se añadieron unas gotas de 1,7 % glutaraldehído en 0,01 M fosfato sódico, 0,15 M cloruro sódico, pH 7,4, y se incubó a temperatura ambiente 10 minutos. El exceso de glutaraldehído se absorbió con papel de filtro varias veces, y los papeles Whatman se levantaron dejando los coágulos extendidos y pegados sobre el porta. Los coágulos se lavaron cuidadosamente una vez en agua destilada y a continuación se secaron a temperatura ambiente. Después se tiñeron con 0,025 % de azul de toluidina en 0,01 M borato sódico, pH 8,8 durante 10 minutos, además de 10 minutos de diferenciación en agua corriente, secado al aire y montado permanente en Permount (Fisher Sci. Co. NJ,

EE.UU.). Otros detalles de estos tratamientos se describen en otras publicaciones^{7,8}. Las colonias y las células se contaron con ayuda de una pieza ocular a 100 x y a 400 x, respectivamente.

RESULTADOS

El número de células redondeadas (leucocitos) obtenidos por gramo de trucha fue de alrededor de 50.000 (fig. 1). La composición de las células del riñón de trucha varía de un individuo a otro, tal y como se ha estudiado en los coágulos fijados antes de la incubación. Las células redondeadas varían entre el 70-90 % del total celular, siendo el resto los eritrocitos. La abundancia de eritrocitos dependía del sangrado de la trucha antes de la extracción del riñón. Las células redondeadas eritroides se diferenciaban fácilmente por la cromatina densa de su núcleo y el color pálido-verdoso de su citoplasma; su número estaba entre el 10-20 % de las células redondeadas. Las células redondeadas no eritroides se pudieron clasificar como linfocitos, células de núcleo grande, células multinucleadas, células de núcleo excéntrico y células adherentes. Las células adherentes podían aislarse incubando la suspensión celular durante una semana en cultivo líquido en botellas de plástico. La figura 2 resume las características de estos tipos celulares y la composición del riñón de trucha procedente de varios experimentos. Aunque existe una gran variación, los linfocitos son mayoritarios (35 %), mientras que las células adherentes se encuentran en la menor proporción (5 %).

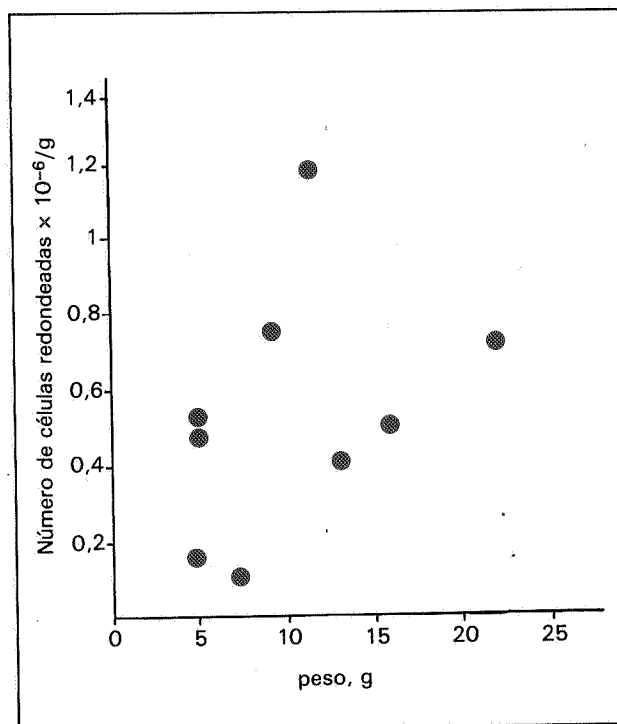


Fig. 1. Número de células redondeadas (leucocitos) por gramo de trucha en función del peso de la trucha. Cada punto representa un individuo.

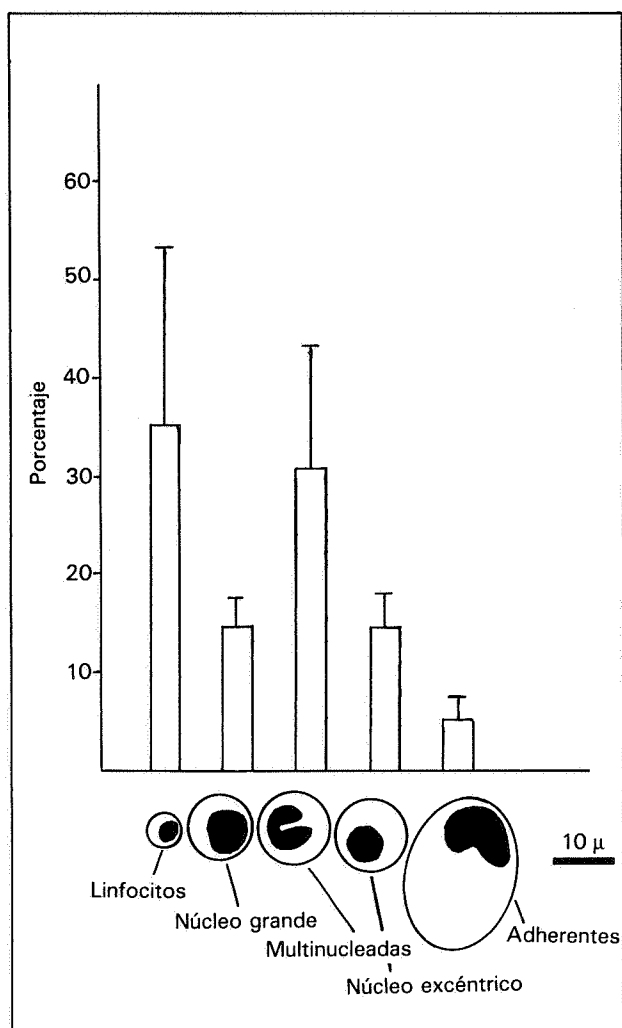


Fig. 2. Características celulares y composición de los leucocitos de riñón de trucha. Los leucocitos de riñón anterior (pronefros) de trucha se clasificaron en: linfocitos, células con núcleo grande, células con núcleo excéntrico y células adherentes. Los tipos celulares se han esquematizado a escala siendo la barra horizontal a la derecha de 10 µ. En la figura se representa la distribución porcentual de los datos obtenidos de 6 truchas. Las truchas se sacrificaron en agosto, noviembre, diciembre, enero, junio y septiembre. No se encontraron correlaciones entre las fechas y/o las temperaturas y las variaciones individuales de la composición de células de sus riñones.

En los cultivos obtenidos en presencia de fitohemaglutinina pueden observarse tanto células como colonias compuestas de un solo tipo de células. Las células que se observan en cultivo son similares morfológicamente a las que se observan en el riñón de trucha antes de iniciar el cultivo. Las colonias sólo se observaron en los cultivos obtenidos en presencia de fitohemaglutini-

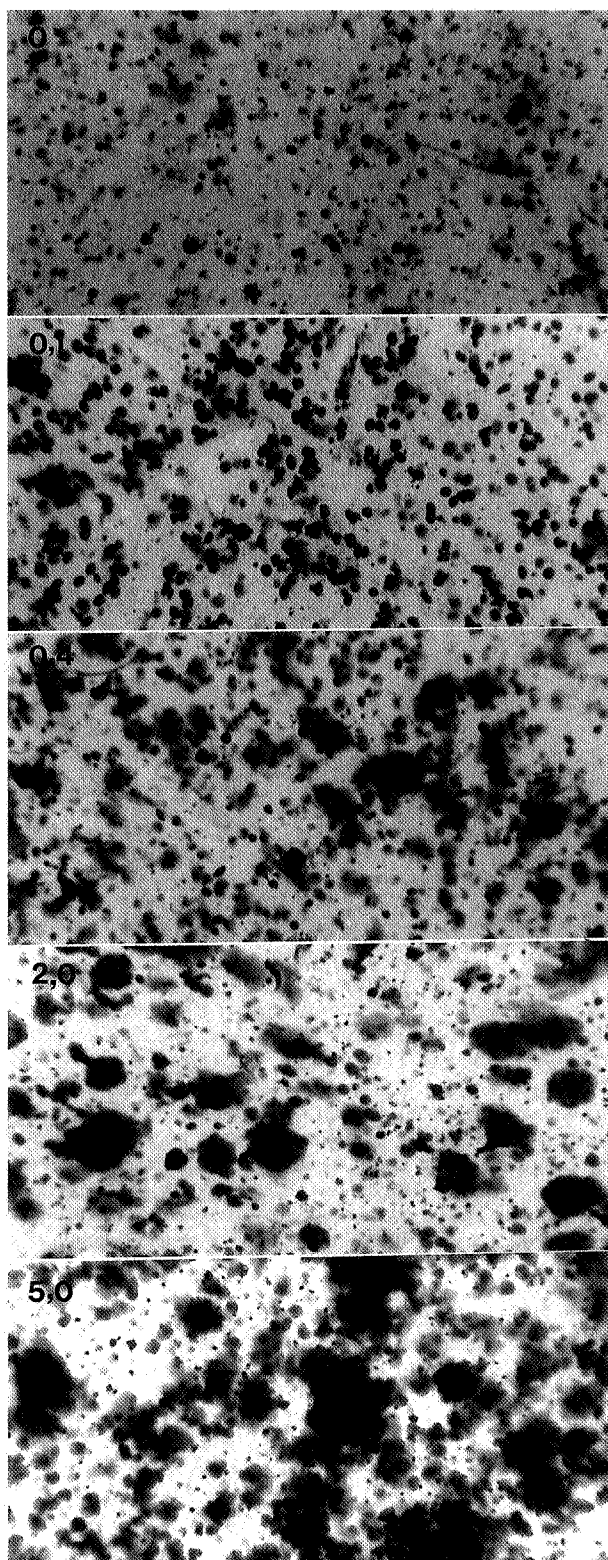


Fig. 3. Aparición de colonias en función de la concentración de PHA. Los linfocitos de riñón de trucha se incubaron a 20° C durante 2 semanas en presencia de 0, 0,1, 0,4, 2 y 5 µg de PHA/ml $\times 200$.

na. A mayor concentración de fitohemaglutinina (de 0,1 a 5 $\mu\text{g/ml}$) mayor número de colonias se obtienen (fig. 3). Ahora bien, con concentraciones mayores de fitohemaglutinina el número de colonias y de células se reduce hasta desaparecer completamente.

Después de 2 semanas de cultivo pueden observarse 3 tipos principales de colonias compuestas por linfocitos, células de núcleo excéntrico-multinucleado y células de núcleo grande (fig. 4). La composición relativa entre el número de colonias de cada tipo dependía de cada trucha particular.

Un resultado típico se ofrece en la figura 5. Los linfocitos formaban colonias muy raramente, mientras que el mayor número de colonias correspondía a las compuestas por células de núcleo excéntrico-multinucleado seguidas por las de núcleo grande (fig. 5).

El número de linfocitos presentes a tiempo 0 disminuye drásticamente durante los primeros días en cultivo, mientras que el número de las otras células o aumentaba ligeramente, o permanecía aparentemente constante. El número de colonias, sin embargo, era totalmente dependiente de la presencia de fitohemaglutinina. Las células adherentes aparecían en pequeño número, pero nunca formaban colonias. El número relativo de células adherentes aumentaba con la edad del cultivo, siendo el único tipo celular superviviente después de 3 semanas de cultivo.

Aunque del examen de los cultivos inmediatamente antes de la incubación no fue posible detectar colonias o grupos de células, para confirmar que las colonias de células no eran grupos de células inducidos por la hemaglutinina, su tamaño se estimó a 2 tiempos diferentes durante el cultivo. El tamaño medio de las colonias aumentó de 10 células por colonia ($n = 50$) a 19 células por colonia ($n = 50$) del día 7 al día 19 de cultivo (tabla I). Todas las colonias inducidas por la fitohemaglutinina estaban compuestas por un solo tipo de células. Las figuras mitóticas podían observarse en un 2-5 % de las células en las colonias.

DISCUSIÓN

La respuesta de los leucocitos de trucha a la fitohemaglutinina fue heterogénea, originando la estimulación de, al menos, 5 tipos de células reconocibles morfológicamente.

TABLA I. Distribución de tamaños de colonias estimuladas con fitohemaglutinina en función del tiempo y temperatura de cultivo

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (días)	Tamaño, células/colonia
14	9	6,0
14	26	10,1
20	7	10,5
20	14	19,0

Las células se cultivaron en presencia de 2 μg de PHA/ml. El tamaño de las colonias se estimó por el recuento del número de células en 50 colonias por punto a $\times 400$.

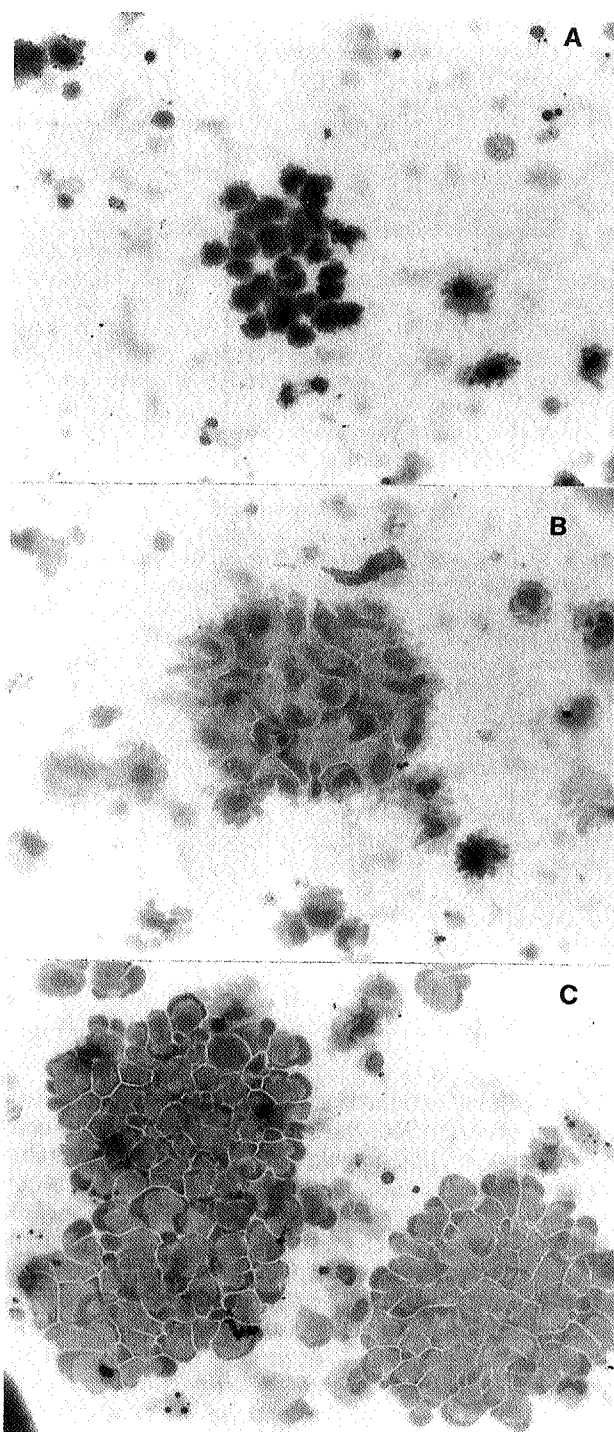


Fig. 4. Tipos de colonias desarrollados en cultivo en presencia de fitohemaglutinina. Las células de riñón de trucha se incubaron a 20°C durante 2 semanas en presencia de 5 μg de PHA/ml; a) colonias de linfocitos; b) colonias de células de núcleo excéntrico (muy similares morfológicamente a las colonias de células multinucleadas), y c) colonias de células de núcleo grande $\times 800$.

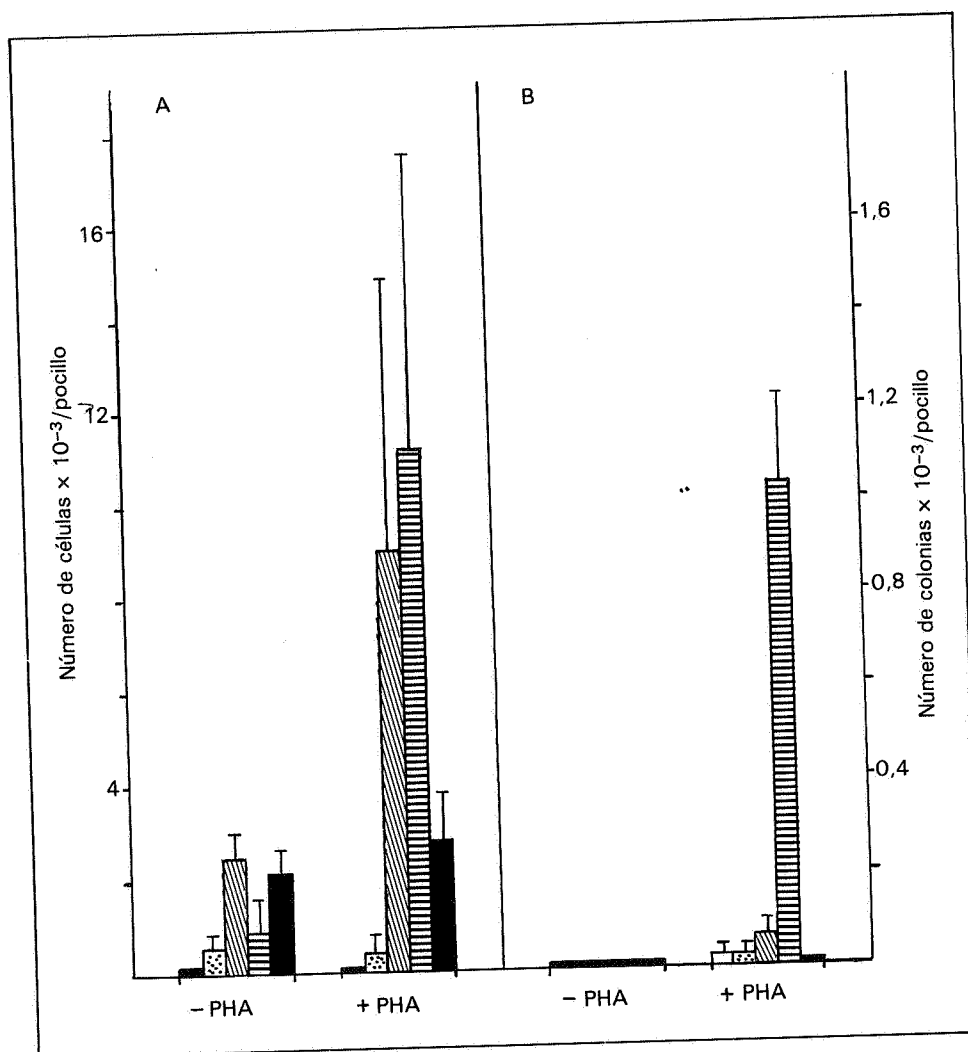


Fig. 5. Número de células (A) y de colonias (B) inducidas por concentraciones óptimas de fitohemaglutinina. Las células de riñón de trucha se incubaron durante 2 semanas a 20° C a una concentración de 25.600 células por pocillo en presencia de 2 µg de fitohemaglutinina/ml. Cuatro pocillos se incubaron por cada punto y las células y colonias de un campo por pocillo se contaron. Las diferentes medias y sus desviaciones estándar se representan en la figura: , linfocitos; , células con núcleo grande; , células multinucleadas; , células con núcleo excéntrico, y , células adherentes.

Las células estimuladas por fitohemaglutinina estaban en proliferación, ya que aparecían colonias compuestas por un tipo homogéneo de células, aumentaban de tamaño con el tiempo de incubación y podían observarse figuras mitóticas en ellas. Puesto que el método basado en los coágulos de fibrina permite estudiar no sólo la proliferación celular, como con la incorporación de timidina tritiada^{2,3}, sino también la supervivencia o diferenciación celular sin proliferación, este método puede permitir el estudio de señales inmunológicas más complejas que las simplemente mitogénicas. Por ejemplo, la estimulación de la supervivencia celular parece ser un primer paso para los efectos subsiguientes de factores de crecimiento, tal y como ha sido demostrado recientemente para otras células hematopoyéticas¹¹.

Las células de riñón de trucha estimuladas por fitohemaglutinina en este estudio han sido identificadas solamente en base a su morfología, para evitar cualquier confusión o analogía con sus equivalentes morfológicos en mamíferos. De acuerdo con la morfología definida con anterioridad, las células de núcleo grande son similares a los blastos, las células multinucleadas

son similares a los leucocitos polimorfonucleares y las células adherentes son similares a los macrófagos y a los melanomacróforos¹². Sin embargo, el correcto análisis funcional de las células identificadas en este estudio debe aguardar el resultado de otras investigaciones en curso. Por ejemplo, algunos experimentos, actualmente en desarrollo, demuestran la estimulación específica, tanto de las células de núcleo excéntrico como de las multinucleadas con un panel de anticuerpos monoclonales antiinmunoglobulinas de trucha, así como respuestas específicas de células adherentes ante la presencia de proteínas purificadas de virus de salmonidos.

El método empleado en este trabajo para cultivar células de riñón de trucha es similar a las técnicas basadas en el uso del agar como medio semisólido para cultivar los linfocitos de la sangre de trucha^{13,14}. Ahora bien, dichos estudios no han descrito la morfología detallada de los tipos celulares implicados en las respuestas a mitógenos. Además, incluso usando agar con bajo punto de gelificación, las células de riñón de trucha son especialmente sensibles a las temperaturas por encima de los 20° C. Por otra parte, los lotes de agar

son altamente variables y algunos incluso tóxicos. El método utilizado aquí tiene, por lo tanto, todas las ventajas de un medio semisólido y las altas eficiencias de clonaje debidas al uso de sustancias más fisiológicas para producir el medio semisólido (fibrinógeno y trombina). En contraste con aquellos autores que defienden la estimulación específica de linfocitos T con PHA^{2,4} basados solamente en la incorporación de timidina a poblaciones no identificadas de leucocitos, la aparición en proliferación de distintos tipos morfológicos celulares con un único mitógeno sugiere mecanismos más sencillos de estimulación generalizada de leucocitos de trucha.

AGRADECIMIENTO

Se agradece al Dr. Agustín Zapata del Departamento de Biología Celular de la Universidad Complutense de Madrid el uso de su colección de bibliografía; a Marta Torroba (Universidad Complutense) el haber preparado algunas células de trucha y a Francisco Álvarez (Universidad de León) su ayuda en los primeros experimentos. También se agradece a J. Coll Pérez su ayuda con la mecanografía y los dibujos. Este trabajo estuvo financiado por las ayudas a la investigación n.ºs 8.568 y 8.171 del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (España).

Bibliografía

1. Sánchez MCT, Coll JM. La estructura de las inmunoglobulinas de peces. *Immunología*, 1989; 8:47-54.
2. Warr GW, Simon RC. The mitogen response potential of lymphocytes from the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) reexamined. *Dev Comp Immunol* 1983; 7:379-384.
3. De Luca D, Wilson M, Warr GW. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur J Immunol* 1983; 13:546-551.
4. Faulmann E, Cuchens MA, Lobb CJ, Miller NW, Clem LW. An effective culture system for studying *in vitro* mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Trans Am Fish Soc* 1983; 112:673-679.
5. Blaxhall PC, Sheard PR. Preliminary investigation of the characteristics of fish lymphocytes separated on a Percoll discontinuous gradient. *J Fish Biol* 1985; 26:209-216.
6. Kaattari SL, Irwin MJ, Yui MA, Tripp RA, Parkins JS. Primary *in vitro* stimulation of antibody production by rainbow trout lymphocytes. *Vet Immunopathol* 1986; 12:29-38.
7. Coll JM, Ingram VM. Stimulation of heme accumulation and erythroid colony formation in cultures of chick bone marrow cells by chicken plasma. *J Cell Biol* 1978; 76:184-190.
8. Rueda A, Coll JM. Cloning of myelomas and hybridomas in fibrin clots. *J Immunol Methods* 1988; 114:213-217.
9. Jiménez J, Marcotegui MA, San Juan ML, Basurco B. Diagnosis of viral diseases in Salmonid farms in Spain. *Bull Europ Associat Fish Pathol* 1988; 27:1-3-4.
10. Kaastrup P, Nielsen B, Horlyck V, Simonsen M. Mixed lymphocyte reactions (MLR) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sibling. *Dev Comp Immunol* 1988; 12:801-808.
11. Williams GT, Smith CA, Spooncer E, Dexter TM, Taylor DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990; 343:76-79.
12. Plytycz B, Flory CM, Galván I, Bayne CJ. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. *Dev Com Immunol* 1989; 13:217-224.
13. Finegan CB, Mulcahy MF. Successful culture of rainbow trout lymphocytes in soft agar. *Dev Comp Immunol* 1987; 11:419-425.
14. Caspi RR, Rozenszajn LA, Gothelf Y, Pergamenikov-Litvak T, Avtalion RR. The cells involved in the immune response of fish: II PHA-induced clonal proliferation of carp lymphocytes in soft agar culture. *Dev Comp Immunol* 1982; 6:663-689.