

Diseño de un protocolo para el aislamiento de células cebadas del exudado peritoneal de *Sparus aurata* para la identificación de receptores de estrógenos

Nuria Esther Gómez-González*, Érick García-García, Alfonso García-Ayala, Victoriano Mulero

Departamento de Biología Celular e Histología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia.

* correspondencia: nuriaesther.gomez@um.es

Resumen

La contaminación de las aguas por disruptores endocrinos, y en concreto de estrógenos sintéticos, crece diariamente pudiendo causar cambios en el sistema inmunitario en los animales que en ellas habitan al presentar en las células que lo componen receptores de estrógenos. La inflamación es la primera respuesta de los animales frente a una infección o daño en el tejido. La histamina tiene un papel muy importante en la regulación de la inflamación en vertebrados capaces de almacenarla en células especializadas inmunitarias llamadas células cebadas. *Sparus aurata* presenta histamina en las células cebadas de tejidos mucosos. El exudado peritoneal de *S. aurata* está enriquecido en células cebadas. Hemos identificado que el exudado peritoneal de dorada está compuesto por linfocitos, granulocitos acidófilos, macrófagos y células cebadas. Hemos diseñado un protocolo de separación de las células cebadas de exudado peritoneal de *S. aurata* consiguiendo puridades superiores al 95% cuando se mide por citometría. Estos datos fueron confirmados mediante microscopía electrónica. Este protocolo de separación servirá como un paso hacia adelante para realizar estudios *in vivo* e *in vitro* orientándonos en la evolución de los mecanismos inflamatorios de vertebrados. También hemos demostrado por citometría de flujo y western-blot utilizando los anticuerpos adecuados que las células cebadas de esta especie presentan el receptor de estrógenos acoplado a la proteína G (GPER). Además, con la idea de poder estudiar en investigaciones futuras el efecto que altas concentraciones de estrógenos causan en el sistema inmune de *S. aurata* intentamos estudiar la capacidad de liberación de histamina en células cebadas tras su estimulación con diferentes PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) lipopolisacáridos (LPS), Poly I:C (análogo sintético de la doble cadena de ARN (dsRNA)) y AND genómico de *Vibrio anguillarum* (VaDNA), aunque ninguno era capaz de inducir la liberación de histamina en estas células.

Abstract

The water pollution by endocrine disruptors, specifically synthetic estrogen, grows daily causing changes in the immune system in the animals that inhabit there due to the presence of estrogen receptor in the cells that compose the immune system. Inflammation is the first response of animals against infection or tissue damage. Histamine has a role in the regulation of inflammation in vertebrates capable of storing specialized immune cells called mast cells. *Sparus aurata* presents histamine from mast cells in mucosal tissues. The peritoneal exudate of *S. aurata* is enriched in mast cells. We have identified that the peritoneal exudate is composed of lymphocytes, acidophilic granulocytes, macrophages and mast cells. We have designed a protocol for the separation of the mast cells contained in the peritoneal exudate of *S. aurata* getting purities greater than 95% when measured by flow cytometry. These data were confirmed by electron microscopy. This separation protocol will serve as a step forward to study *in vivo* and *in vitro* addressing in the evolution of vertebrate inflammatory mechanisms. We have also shown by flow cytometry and western blot using suitable antibodies that the mast cells of this species present G protein-coupled estrogen receptor (GPER). Moreover, with the idea in future research to study the effect that high concentrations of estrogen cause in the immune system of *S. aurata* we tried to study the ability of histamine release from mast cells after stimulation with different PAMPs (pathogen associated molecular patterns) lipopolysaccharide (LPS), Poly I: C (synthetic analog of double-stranded RNA (dsRNA)) and *Vibrio anguillarum* genomic DNA (VaDNA), but none were able to induce histamine release from these cells.

Palabras clave: dorada, GPER, inflamación, histamina

Introducción

La sociedad en la que vivimos actualmente está produciendo gran cantidad de impactos ambientales. Uno de ellos es la contaminación de las aguas y con ello de los organismos que viven en ella. Esta contaminación puede deberse a sustancias inorgánicas u orgánicas. Dentro de estas últimas nos encontramos con las hormonas sintéticas o disruptores endocrinos que son liberados al medio por parte del hombre. En concreto, nosotros centramos nuestra atención en el etinil-estradiol, que es un estrógeno artificial y principio activo de la píldora anticonceptiva. El uso creciente de este fármaco está provocando el incremento de manera importante de las concentraciones de estrógeno en las aguas marinas (García-Reyero et al. 2011; Hinteman et al. 2006; Johnson et al. 2005; Ternes et al. 1999; Desbrow et al. 1998). Además de alteraciones en diferentes aspectos de la fisiología de los organismos (Vos et al. 2000; Tayler et al. 1998), está documentado que algunos disruptores endócrinos provocan cambios en el sistema inmunitario de los organismos (Liarte et al. 2011a y b; Lai et al. 2009; Ahmed 2000,) pues diferentes leucocitos presentan distintos receptores para hormonas esteroides (Couse 1997).

La inflamación es una respuesta de los organismos generada por daños en los tejidos. La respuesta inflamatoria surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, y posteriormente reparar el tejido u órgano dañado. En este proceso de inflamación, y la subsecuente activación de la respuesta inmunológica, intervienen las células del sistema inmunitario, entre otras, células cebadas, neutrófilos, macrófagos y linfocitos. La respuesta inflamatoria pueden ser iniciada por agentes biológicos (bacterias, virus, parásitos u hongos), alteraciones inmunitarias (hipersensibilidad o autoinmunidad) o bien por daños a los tejidos.

La activación del proceso inflamatorio es llevada a cabo por las células del sistema inmunitario innato tras el reconocimiento de moléculas pro-inflamatorias que son indicativas de daño. Estas moléculas pueden ser derivados microbianos, o bien sustancias derivadas de los propios tejidos dañados. Algunos derivados microbianos capaces de actuar como moléculas pro-inflamatorias se conocen como PAMPs. Los PAMPs o patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen-associated molecular patterns) son moléculas asociadas a componentes estructurales conservados de distintos patógenos. Los PAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (Pattern-recognition receptor, PRRs). El reconocimiento de los PAMPs por parte de las células de la inmunidad innata activa distintas funciones celulares, dependiendo del microorganismo identificado. Dentro de las sustancias capaces de activar la inflamación generadas por los organismos en respuesta al daño tisular se encuentran pequeñas moléculas de origen plasmático o celular que pueden ser lípidos (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos), aminoácidos modificados (histamina, serotonina) y pequeñas proteínas (citoquinas, factores de crecimiento, interleuquinas, ect.). Al igual que los PAMPs, este tipo de sustancias pro-inflamatorias actúa a través de receptores expresados en distintos tipos celulares, regulando sus funciones.

Las células cebadas juegan un papel central en la activación de proceso inflamatorio. Estas células se encuentran en la mayoría de los tejidos del cuerpo y especialmente en la piel, en las mucosas del tracto digestivo y en las vías respiratorias. Las células cebadas son capaces de sintetizar y almacenar mediadores químicos pro-inflamatorios (e.g. histamina, y algunas interleuquinas como IL-1 e IL-6) que pueden ser liberados tras un daño en el organismo. Se conoce una gran variedad de sustancias capaces de activar las funciones pro-inflamatorias de las células cebadas en mamíferos. Entre estas sustancias se encuentran algunas interleuquinas, PAMPs, complejo IgE antígeno, factores del complemento o la prostaglandina E, entre otros (Gilfillan & Tkaczyk 2006). Dada su capacidad para activar el proceso inflamatorio en respuesta a múltiples estímulos, las células cebadas son reconocidas como un componente fundamental para que se desarrolle de la respuesta inmunológica tras la activación del proceso inflamatorio.

La dorada (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) es un pez de agua salada con gran importancia económica ya que es una de las fuentes de alimentación de la población humana y por este motivo ha sido una especie objeto de numerosas investigaciones. En nuestro estudio, es también importante porque, a diferencia de la gran mayoría de vertebrados inferiores, este pez presenta histamina en sus células cebadas (Muller et al. 2007), y en mamíferos esta molécula es un factor pro-inflamatorio esencial. Experimentos preliminares de nuestro grupo de trabajo mostraron que el

exudado peritoneal de dorada está enriquecido en células cebadas, de forma similar al modelo de exudado peritoneal de rata (Diamant 1990), lo que permite obtener grandes números de células para la realización de diferentes ensayos *in vitro*.

A partir de estos antecedentes, el objetivo principal que se plantea en este Trabajo Fin de Máster es el siguiente: Desarrollo de un protocolo de purificación de células cebadas de exudado peritoneal de dorada para analizar las posibles alteraciones en la respuesta inflamatoria por exposición a contaminantes ambientales estrogénicos.

Para poder conseguir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos particulares: (a) identificación de los principales tipos celulares que componen el exudado peritoneal de dorada; (b) purificación de células cebadas del exudado peritoneal de dorada; (c) identificación de receptores de estrógenos en células cebadas del exudado peritoneal de dorada; (d) desarrollo de ensayos de liberación de histamina en células cebadas del exudado peritoneal de dorada como indicador de actividad pro-inflamatoria.

Utilización del ensayo anterior para analizar las posibles alteraciones en la actividad pro-inflamatoria de células cebadas del exudado peritoneal de dorada por exposición *in vitro* e *in vivo* a contaminantes ambientales estrogénicos.

Material y métodos

Para la realización de este trabajo se utilizaron ejemplares de dorada (*Sparus aurata*), con un peso medio de 700 g y de aproximadamente 24 meses de edad criadas en el Centro Oceanográfico de Murcia (Mazarrón). Además se utilizaron ejemplares de ascidias (*Styela plicata* Lesueur, 1823) de vida silvestre con un peso medio de entre 10 y 60 g, colectadas en el puerto deportivo de Águilas (Mazarrón, Murcia).

Se anestesió a los ejemplares de dorada con esencia de clavo a una concentración de 40 ppm en agua de mar para posteriormente ser sacrificados. Posteriormente se inyectaron 10 ml de PBS + 0, 35% NaCl en la cavidad peritoneal y se masajeó el abdomen del pez durante 10 minutos. A continuación se realizó una incisión bajo la aleta lateral para extraer el exudado peritoneal por aspiración. El exudado peritoneal se mantuvo en hielo hasta su procesamiento en la Universidad de Murcia. Posteriormente fue filtrado utilizando tamices de 70 µm de diámetro para eliminar agregados celulares.

Los ejemplares de ascidias fueron inyectados con Buffer Salino para Tunicados (12,06 g MgSO₄·7H₂O (49mM), 1,25 g CaCl₂ (11,3 mM), 28,64 g NaCl (490 mM) y 4,76 g N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-ácido etanosulfónico (HEPES, 20 mM), pH 7.3) por debajo del manto, en una zona cercana al sifón oral con el fin de extraer la hemolinfa que contienen hasta recoger unos 12 ml mediante aspiración. Las muestras recogidas fueron filtradas utilizando tamices de 70 µm de diámetro para eliminar agregados celulares.

Con el fin de separar los linfocitos que forman parte del exudado peritoneal de dorada, éste fue sometido a un gradiente de Ficoll y centrifugado durante 10 minutos a 600 xg. Los linfocitos quedaron formando una interfase separados del resto de tipos celulares que precipitan formando un pellet. Las células de la interfase se desecharon, y sólo se recuperaron las células obtenidas en el pellet.

Tras separar los linfocitos del exudado peritoneal de dorada, el resto de células se cultivaron a una concentración de 10⁷ células/ml de RPMI + 0, 35% NaCl + 5% Suero Fetal Bovino + 1% estreptomycin/penicilina + 1% glutamina durante 24 horas a 25° C. De esta manera las células adherentes quedaron ancladas al fondo de los frascos de cultivo utilizados mientras que el resto quedaron suspendidas en el medio de cultivo.

La selección celular inmunomagnética (Magnetic-activated cell sorting, MACS) es un método de separación de poblaciones celulares gracias a la presencia de antígenos en su membrana externa. Se realiza una incubación de las poblaciones celulares con nanopartículas magnéticas unidas a los anticuerpos necesarios contra un antígeno particular. La población celular que presente ese antígeno quedará retenida en una columna localizada en un campo magnético (fracción positiva). El resto de poblaciones celulares que no presente ese antígeno atravesarán la columna (fracción negativa).

Se recuperaron las células no adheridas de los frascos de cultivo y se lavaron con 10 ml de PBS + 0,35 NaCl, centrifugando a 400 xg por 5 minutos. En algunos experimentos también se recuperaron las células adheridas de los frascos utilizando tripsina. Las células no adheridas se marcaron con los anticuerpos G7 (mouse anti-seabream granulocytes, laboratorio Víctor Mulero, Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia) a una dilución 1:10 y anticuerpo 9H8 (mouse anti-seabream granulocytes, laboratorio Víctor Mulero, Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia) con una concentración 1:100 y se incubaron durante 20 minutos a una concentración de 10^7 células/ml Buffer. Se lavaron con Buffer MACS (PBS + 0, 35% NaCl + 5% Suero fetal Bovino + 2mM EDTA) y se centrifugaron por 5 minutos a 4° C a 400 xg. Se añadieron las nanopartículas magnéticas (anti-mouse IgG microbeads, 130-048-401, Miltenyi Biotec) con una concentración tal que por cada 10^8 células añadimos 200 μ l de bolitas magnéticas + 800 μ l Buffer MACS y se incubaron 30 min en hielo. Se lavaron con Buffer MACS y se centrifugan 5 minutos a 4° C a 400 xg. Las muestras (hasta 10^8 células) se resuspendieron en 500 μ l buffer MACS y se introdujeron en columnas LS en la Unidad de Separación MACS. Se recogió el efluente como fracción negativa. Se retiró la columna del campo magnético para recoger la fracción positiva. Después se hizo pasar la fracción negativa por columnas LD en la MACS Separation Unit y se recogió el efluente como fracción negativa final. Tanto la fracción negativa como la fracción positiva fueron centrifugadas durante 5 minutos a 4° C a 400 xg y resuspendidas a una concentración de 10^7 células / ml PBS.

Utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) se analizaron los valores de tamaño y granularidad intrínseca de 5.000 células por muestra y el anticuerpos G7 para determinar la pureza de las fracciones de granulocitos y células cebadas obtenidas. Tras la separación por MACS las fracciones positiva y negativa se lavaron con buffer FACS (PBS + 0,35% NaCl + 2% Suero Fetal Bovino) y se resuspendieron a 10^7 cells/ ml. De esta suspensión de células se tomó una muestra de 100 μ l y se añadió el anticuerpo G7 a una concentración 1:10. Tras incubar por 40 minutos a 4 °C, las muestras fueron lavadas con buffer FACS e incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (goat anti-rabbit IgG-fluorecein F5262, Sigma Aldrich) a una concentración 1:500 en oscuridad y en hielo durante 20 minutos. Finalmente las muestras fueron lavadas con buffer FACS y analizadas mediante citometría de flujo.

Las poblaciones puras de células cebadas y granulocitos y la población de células adherentes fueron fijadas en tampón cacodilato 0,1 M + 3% glutaraldehído durante 4°C una hora. Posteriormente se lavaron en tampón cacodilato 0,1 M + sacarosa durante toda la noche. Se postfijaron en tetróxido de osmio 1% a 4° C durante 2 horas y media. A continuación se lavaron las células en tampón cacodilato 0,1 M + sacarosa durante 12 horas. Durante dos horas, las células fueron incluidas en acetato de uranilo veronal a 4° C. A continuación se deshidrataron las muestras con concentraciones crecientes de alcohol (30, 50, 70, 90%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se continuó introduciendo las células en alcohol absoluto + sulfato de cobre durante 10 minutos. Este último paso se repitió una vez más. Las muestras fueron introducidas en epon + óxido de propileno en proporción 1/2 durante 45 minutos, después en proporción 1/1 durante 2 horas y a continuación en proporción 2/1 durante dos horas para finalmente dejarlas toda la noche en epon puro. Finalmente se hacen cápsulas de epon puro y se deja en estufa a 70° C. Se realizaron secciones con el ultramicrotomo Leica UC6 y contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1961). Finalmente las secciones fueron observadas en el Microscopio JEOL JEM-1011 con una aceleración de 80 KV. La captación de imágenes fue realizada con una cámara digital GATTAN BIOSCAN modelo 792.

Para determinar la presencia del receptor de estrógenos GPER las fracciones puras de células cebadas y granulocitos fueron fijadas en PBS + PFA 4% durante 15 minutos a 4 °C. Se incubaron durante 30 minutos y en hielo con un anticuerpo comercial contra GPER (rabbit anti-human IgG-GPR30, SC-48525-R, Invitrogen) a una concentración de 1:500 en buffer FACS + Tritón 0,1%. Se lavaron con Buffer FACS y se incubaron 20 minutos en hielo y en oscuridad con el anticuerpo comercial anti IgG de ratón conjugado a ficoeritrina a una concentración 1:500. Finalmente las muestras fueron lavadas con buffer FACS y analizadas mediante el citómetro de flujo FACSCalibur.

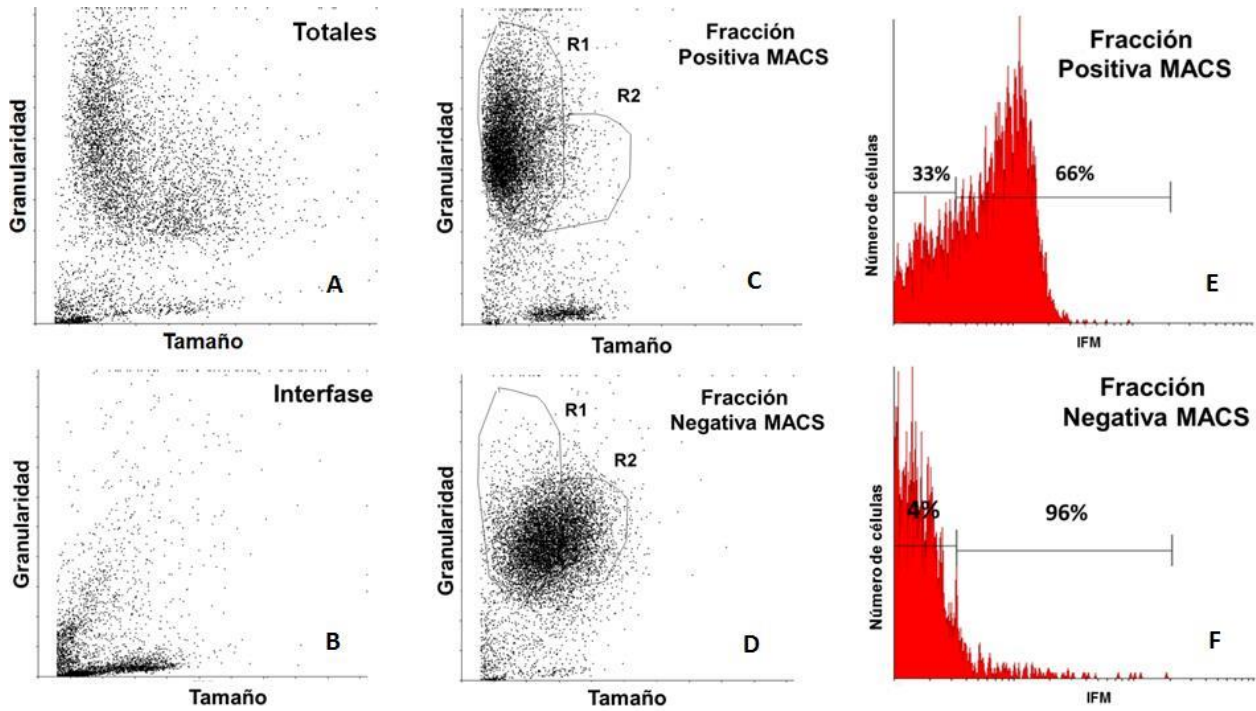


Figura 1. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares del exudado peritoneal de dorada. Representación de la distribución celular en función de tamaño y granularidad (figuras A a D): A) Células totales; B) Linfocitos obtenidos tras un gradiente de ficoll; C) Granulocitos acidófilos obtenidos como fracción positiva tras separación por MACS; D) Células cebadas obtenidas como fracción negativa tras separación por MACS; E) Histograma de intensidad media de fluorescencia relativo a la tinción con el anticuerpo G7 (anti-granulocitos) de la fracción positiva MACS; F) Histograma de intensidad media de fluorescencia en la fracción negativa MACS con tinción G7.

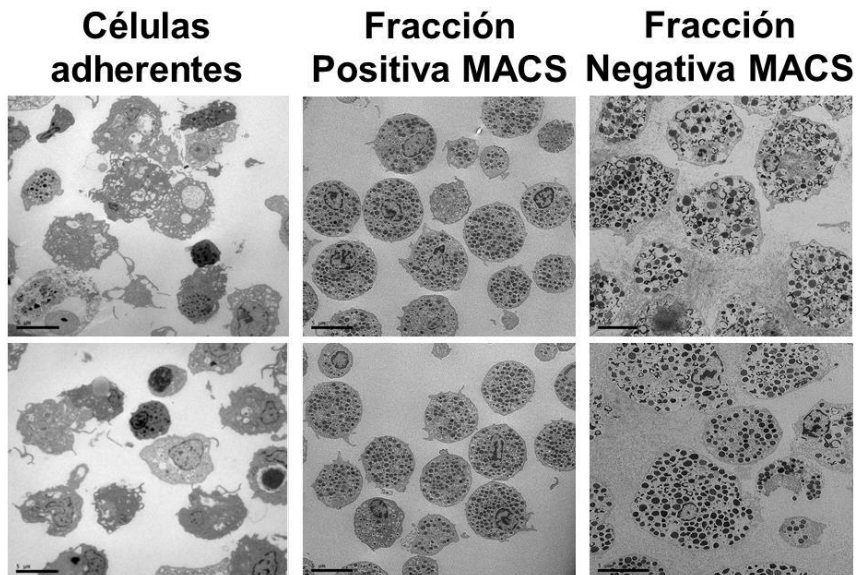


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a las células adherentes obtenidas tras el cultivo en medio RPMI durante 24 horas y granulocitos acidófilos y células cebadas purificados mediante separación por MACS.

Células de las fracciones positiva y negativa obtenidas tras la separación por MACS fueron lisadas con tampón de lisis (10 mM Tris, SDS 1%, pH 7.4). Se cuantificó la concentración de proteína en los lisados celulares utilizando el kit micro BCA (Pierce), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para la separación de proteínas por SDS-PAGE, se cargaron 50 µg de proteína en cada calle. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con 5% de leche en polvo en tampón de western (1 ml de HCl 6N, 10 mM Tris, 100mM NaCl, tween 1% en 100 ml de agua, pH 7.5) por dos horas. Posteriormente se incubó con un anticuerpo anti GPR30 humana (número de catálogo, etc.) a una dilución de 1:200 durante 1 hora, se lavó con tampón de western por diez minutos tres veces y se incubó con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo-HRP a una concentración 1:5000 durante 1 hora. La membrana se reveló finalmente por quimioluminiscencia.

Para inducir la liberación de histamina en las células cebadas del exudado peritoneal de dorada las células se incubaron por 45 minutos con diferentes concentraciones de diferentes PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) LPS (lipopolisacáridos), VaDNA (DNA genómico de *Vibrio angillarum*) y Poly I:C (análogo sintético de la doble cadena de ARN (dsRNA)) a diferentes concentraciones.

Células cebadas de *S. aurata* y hemocitos de *S. plicata* (1×10^6 células por muestra) fueron fijadas con 2% EDAC en PBS + 0,35% NaCl por 18 horas. Posteriormente las células se permeabilizaron con saponina al 0,1% por 30 minutos a 4 °C. Las células se centrifugaron a 1000 xg por 4 minutos y se lavaron con 1ml de PBS + 4% FBS. Las células se bloquearon por una hora con 500 µl de PBS + 4% FBS, y luego se incubaron con el anticuerpo anti-histamina (rabbit anti-histamine, AB5885, Millipore) a una dilución 1:300 en 100 µl PBS+4% FBS. Tras un lavado con 500 µl de PBS+4% FBS, las células se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a ficoeritrina (goat anti-rabbit IgG-phycoerythrin, A10542, Invitrogen) a una dilución 1:500 en 100 µl PBS+4% FBS. Tras un último lavado la fluorescencia asociada a las células se analizó por citometría de flujo.

Se realizaron ensayos de ELISA (ensayos de inmunoabsorbancia ligados a enzimas) para detectar liberación de histamina por parte de las células cebadas del exudado peritoneal de dorada y de los hemocitos de ascidias utilizando dos tipos de kits para histamina, Histamine Enzyme Immunoassay Kit (A0589, SPI-BIO, Francia) e Histamine ELISA Fast Track (BA-E 1700, LDN, Alemania), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y para cuatro individuos. Se utilizaron 500.000 células por pocillo de placa de 96 pocillos en 100 µl de medio. Se centrifugó a 2000 xg por 10 minutos. Se recuperó 80 µl del sobrenadante y se congeló a -80°C hasta su procesamiento.

Los datos fueron analizados mediante análisis de ANOVA ($p \leq 0,05$) para identificar la varianza entre grupos.

Resultados y discusión

Purificación de células cebadas del exudado peritoneal de dorada

Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio indicaron que el exudado peritoneal de *S. aurata* estaba compuesto por células cebadas, granulocitos acidófilos, linfocitos y posiblemente otras células adherentes. El análisis por citometría de flujo del exudado peritoneal de dorada muestra la distribución celular, según parámetros de tamaño y granularidad, (Fig. 1A). Resultados previos de nuestro grupo indicaron que las células más pequeñas y menos granulares son principalmente linfocitos. Las células más granulares de tamaño mediano corresponden a los granulocitos acidófilos, que son reconocidos por el anticuerpo G7. Las células de mayor tamaño con granularidad intermedia corresponden a macrófagos otras células adherentes, y a células cebadas.

La centrifugación de las células del exudado peritoneal en un gradiente de Ficoll consiguió separar los linfocitos (células pequeñas y poco granulares) del resto de las células contenidos en una interfase (Fig. 1B). Tras el cultivo durante 24 horas en RPMI + 0,35% + 5% SFB se consiguió separar las células adherentes del resto de células. El análisis por citometría de flujo y por microscopía electrónica de transmisión muestra que, tras la separación por MACS, las fracciones positiva y negativa resultantes están altamente enriquecidas en granulocitos acidófilos y células

cebadas, respectivamente (Fig. 1C y 1D, Fig. 2). Por otro lado, las células adherentes recuperadas de los frascos de cultivo muestran una morfología heterogénea de acuerdo al análisis por microscopía electrónica de transmisión (Fig. 2).

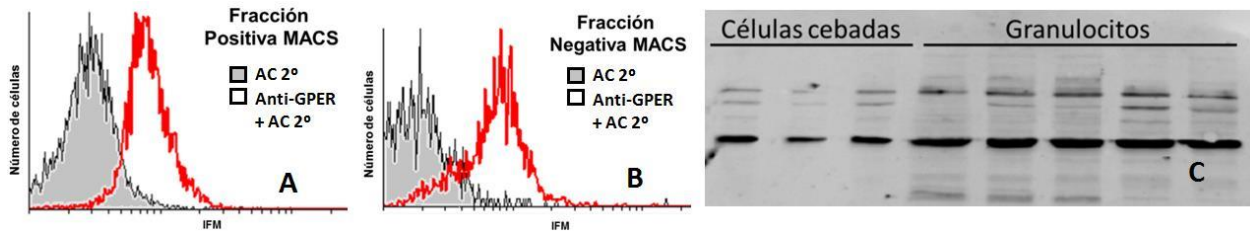


Figura 3. Identificación de GPER en células cebadas del exudado peritoneal de dorada mediante citometría de flujo (A y B) y Western blot (C).

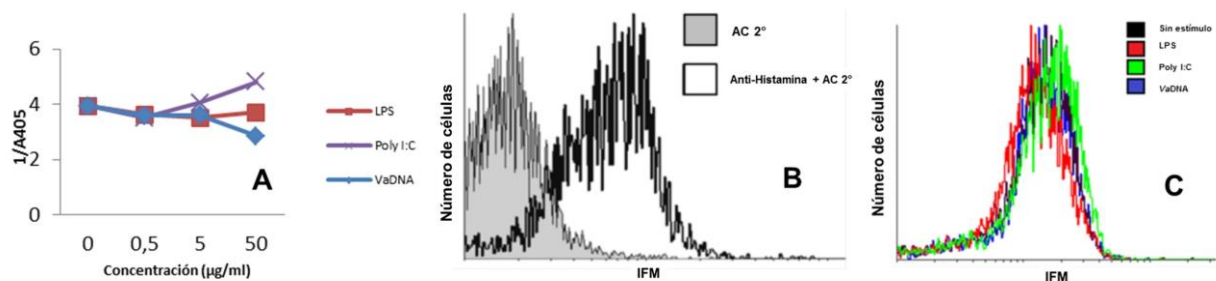


Figura 4. Análisis de presencia y liberación de histamina en células cebadas del exudado peritoneal de dorada. A) Ensayos de liberación de histamina mediante ELISA en células cebadas de dorada tratadas con PAMPs. Este ensayo es una ELISA de competición, por lo que se representan los valores inversos de absorbancia (1/A405). B) Análisis mediante citometría de flujo de una tinción intracelular que demuestran la presencia de histamina en el interior células cebadas del exudado peritoneal de dorada. C) Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo que muestran los niveles de histamina presente en las células cebadas tras su estimulación con LPS, Poly I:C y VaDNA.

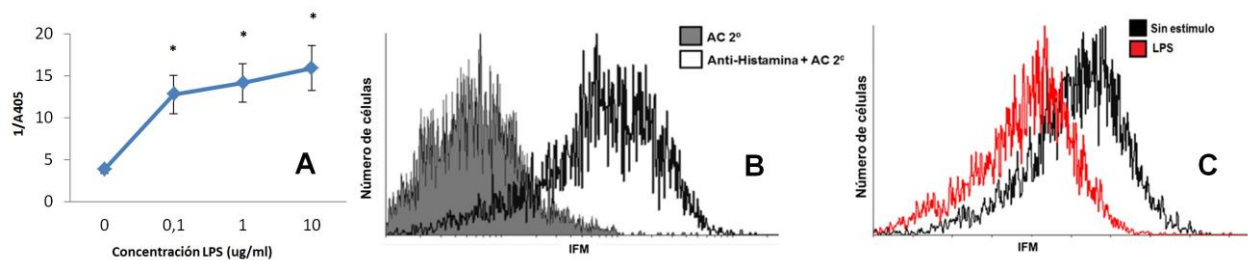


Figura 5. Análisis de presencia y liberación de histamina en hemocitos de la hemolinfa de *S. plicata*. A) Liberación de histamina en hemocitos de ascidia tras su estimulación con LPS. Se representan los valores inversos de absorbancia al tratarse de una ELISA de competición. B) Histograma obtenido mediante citometría de flujo en el que se muestra la presencia de histamina intracelular en los hemocitos de la hemolinfa de ascidia. C) Análisis por citometría de flujo de liberación de histamina en hemocitos de ascidia tras ser estimulados con LPS.

De acuerdo al análisis de citometría de flujo las poblaciones de granulocitos y células cebadas se sobrelapan de forma parcial en los Dot-plots (Fig. 1C y 1D). La pureza relativa de la fracción negativa (células cebadas) fue calculada en función de parámetros de tamaño y granularidad y de ausencia de señal tras la tinción con anticuerpo G7, que reconoce granulocitos acidófilos (Fig. 1E y 1F). De acuerdo a este análisis la pureza relativa de las células cebadas se ubica alrededor del 95%.

Análisis de expresión de GPER en células cebadas de S. aurata

La identificación de receptores de estrógenos en células cebadas del exudado peritoneal de dorada era una condición necesaria para poder estudiar el posible efecto que la exposición a estrógenos tendría sobre estas células. En concreto, se decidió identificar en las células cebadas la expresión del de estrógenos GPER, pues resultados obtenidos por nuestro grupo han mostrado que estrógenos sintéticos o agonistas de este receptor modifican las funciones normales de granulocitos acidófilos de *S. aurata*.

Una vez obtenidas preparaciones enriquecidas en células cebadas se analizó la expresión de GPER por citometría de flujo y por Western-Blot. De acuerdo a la tinción para citometría de flujo, la expresión de GPER es mayor en granulocitos acidófilos, que en células cebadas (Fig. 3A y 3B). Lo anterior se observa también por Western-blot (Fig. 3C), dónde además se observa que la principal proteína reconocida por el anticuerpo tiene el peso molecular adecuado 43 KDa).

Ensayos de liberación de histamina

Durante el desarrollo de este trabajo se buscó utilizar la liberación de histamina como un indicativo de la actividad pro-inflamatoria de las células cebadas. La histamina es una molécula que se almacena en gránulos intracelulares en células cebadas de mamíferos y algunos vertebrados inferiores como reptiles, aves y algunas especies de peces (Mulero et al. 2007). Por este motivo, intentamos medir la liberación de histamina mediante ELISA y citometría de flujo. Estudios previos de nuestro laboratorio y otros grupos de investigación mostraron que los PAMPs VaDNA, Poly I:C y LPS actúan sobre granulocitos acidófilos a través de distintos receptores TLRs: LPS-TLR4, Poly I:C-TLR3, ADN de *Vibrio anguillarum*-TRL9 (Sepulcre et al. 2007).

No se detectó histamina en los sobrenadantes de células cebadas estimuladas con estos PAMPs por ELISA (Fig. 4A). Tampoco se observó una disminución en los niveles de histamina intracelular medidos por citometría de flujo, tras la estimulación de las células cebadas con los PAMPs (Fig. 4B y 4C).

Un proyecto paralelo que se desarrolla en nuestro laboratorio busca determinar la posible función de la histamina como mediador pro-inflamatorio en invertebrados; particularmente en el tunicado *Styela plicata*. A diferencia de lo observado con las células cebadas de dorada, la estimulación de los hemocitos de *S. plicata* con distintos PAMPs (e.g. LPS, Fig. 5) indujo la liberación de histamina, que pudo medirse por ELISA o por citometría de flujo. Estos resultados indican que la imposibilidad de detectar la liberación de histamina por parte de las células cebadas de dorada no se debe a un problema técnico.

Conclusiones

- El exudado peritoneal de dorada presenta principalmente células cebadas, granulocitos, macrófagos y linfocitos.
- Se ha conseguido diseñar un protocolo de purificación de células cebadas del exudado peritoneal de dorada.
- Se identificó la expresión de GPER por citometría de flujo y western blot.
- Según nuestras condiciones, los diferentes PAMPs que utilizan no fueron capaces de liberar histamina en las células cebadas del exudado peritoneal de dorada.

Agradecimientos

A todo el personal del Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, de los servicios de Microscopía y Cultivos del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, del Centro Oceanográfico de Mazarrón y del Puerto Deportivo de Águilas. Financiación: Fundación Séneca, 04538/GERM/06; MICINN, AGL2011-30264-C02-01) y Comisión Europea (FEDER/ERDF).

Referencias

- Ahmed S A. 2000. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology* 150: 191-206.
- Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA & Korach KS. 1997. Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α (ER α) and Estrogen Receptor- β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER α -knockout Mouse. *Endocrinology* vol. 138, 11: 4613-4621.
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP & Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* 32: 1549-1558.
- Diamant B. 1990. New insights into the mechanisms of histamine release from rat peritoneal mast cells. *Chemical Immunology* 49: 142-72.
- García-Reyero N, Lavelle CM, Escalon BL, Martinovic D, Kroll KJ, Sorensen PW & Denslow ND. 2011. Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquatic Toxicology* 101: 38-48.
- Gilfillan AM & Tkaczyk C. 2006. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature*, vol. 6: 218-230.
- Hinteman T, Schneider C, Schöler HF & Schneider RJ. 2006. Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Research* 40: 2287-2294.
- Johnson AC, Aerni HR, Gerritsen A, Gibert M, Giger W, Hylland K, Jürgens M, Nakari T, Pickering A, Suter MJ, Svenson A & Wettstein FE. 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research* 39: 47-58.
- Lai KM, Scrimshaw MD & Lester JN. 2002. The effects of natural and synthetic steroid estrogens in relation to their environmental occurrence. *Toxicology*. 32: 113-32.
- Liarte S, Cabas I, Chaves-Pozo E, Arizcun M, Meseguer J, Mulero V & García-Ayala A. 2011. Natural and synthetic estrogens modulate the inflammatory response in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) through the activation of endothelial cells. *Molecular Immunology* 48: 1917-25.
- Liarte S, Chaves-Pozo E, Abellán E, Meseguer J, Mulero V & García-Ayala A. 2011. 17 β -Estradiol regulates gilthead seabream professional phagocyte responses through macrophage activation. *Developmental & Comparative Immunology* 35: 19-27.
- Mulero I, Sepulcre MP, Meseguer J, García-Ayala A & Mulero V. 2007. Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, 49: 19434-19439.
- Sepulcre MP, López-Castejón G, Meseguer J & Mulero V. 2007. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of the bony fish. *Molecular Immunology* 44: 2019-2026.
- Smith VJ & Peddie CM. 1992. Cell cooperation during host defense in the solitary tunicate *Ciona intestinalis* (L). *Biological Bulletin* 138: 379-388.
- Ternes TA, Kreckel P & Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment* 225: 91-99.
- Tyler CR, Jobling S & Sumpter JP. 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Toxicology* 28: 319-361.
- Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I & Vethaak AD. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Toxicology* 30: 71-133.