

QUIMIOTAXIS BAJO AGAROSA

METODO PARA MEDIR LA QUIMIOTAXIS DE LOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS

D. GARCIA DE O., F. TORO

Conocedores de la importancia de la quimiotaxis de los polimorfonucleares neutrófilos en el proceso de la fagocitosis y del número creciente de informes en la literatura sobre pacientes que presentan diversos cuadros clínicos relacionados con una deficiencia quimiotáctica, realizamos el presente estudio con el objeto de estandarizar una modificación de la técnica de quimiotaxis bajo agarosa descrita por Nelson y colaboradores.

La movilización de las células fagocíticas polimorfonucleares neutrófilas hacia los focos de inflamación es de gran importancia en la defensa del huésped contra la infección puesto que tienen la capacidad de ingerir y destruir partículas extrañas. El movimiento puede ser espontáneo en ausencia de estímulos o dirigido hacia un gradiente de concentración de productos químicos (factores quimiotácticos), originados en el foco inflamatorio (quimiotaxis).

Posiblemente el factor quimiotáctico más activo es el péptido C5a y su derivado el C5a des. arg. provenientes de la activación de las vías clásica o alterna del complemento (1-3). Las bacterias invasoras pueden dar origen a sustancias quimiotácticas. Los oligopéptidos N-formil-metionil encontrados en la *Escherichia coli*, representan un mecanismo de reconocimiento natural contra la infección bacteriana. Se han sintetizado di y tri-péptidos con los cuales se ha podido demostrar una relación específica entre su estructura y la actividad quimiotáctica. El compuesto más activo es el N-Formil-Metionil-Leucil-fenilalanina (FMLP)

(4-6). Además estimulan la locomoción de los neutrófilos muchas otras sustancias (7-13).

Para medir la migración de los neutrófilos y los monocitos *in vivo* se ha empleado la técnica de la ventana cutánea de Rebeck (14) y algunas variaciones de la misma (15, 16). Los estudios *in vitro* se han realizado tanto con la cámara descrita por Boyden (17) como con las variantes que se le han hecho (18, 19). Nelson y col. (20) informaron del desarrollo de un nuevo método para investigar la migración espontánea y la quimiotaxis de las células fagocíticas (neutrófilos y monocitos) bajo geles de agarosa en cajas de Petri (21).

MATERIAL Y METODOS

Para la preparación de las células polimorfonucleares neutrófilas se obtuvo sangre periférica de 82 individuos adultos jóvenes normales, en jeringas de plástico desechables que contenían 10 unidades de heparina por ml de sangre. Luego fueron separadas utilizando dextrán al 6% para facilitar la sedimentación de los glóbulos rojos durante una hora a temperatura ambiente. El sobrenadante rico en leucocitos fue pasado a través de un medio separador de linfocitos y centrifugado a 400 Xg por 20 minutos a 4°C. Se descartaron los mononucleares de la interfase y el botón de células que quedó en el fondo del tubo se resuspendió en una solución de cloruro de amonio al 0.87% para lisar los glóbulos rojos contaminantes. Luego los polimorfonucleares fueron lavados dos veces con solución de Hank's (pH 7.4) sin rojo de fenol y suplementada con gelatina al 0.1% en centrifuga refrigerada y resuspendidos en la misma solución a una concentración de 50×10^6 cels/ml.

Se determinó la pureza de los polimorfonucleares en la suspensión de células utilizando

Dra. Diana García de Olarte, Jefe Sección Inmunología; Licenciada Fabiola Toro C, Profesora Sección Inmunología; Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.

Solicitud de separatas a la Dra. García.

coloración con violeta de genciana al 0.1% en ácido acético glacial al 1.5% y viabilidad con azul de tripano al 0.2%. En todos los procedimientos se trabajó con una pureza y una viabilidad por encima del 95%.

Se utilizó como factor quimiotáctico un oligopéptido sintético el FMLP (N-Formil-Metionil-leucil-fenilalanina) el cual fue preparado como una solución madre al 4.5×10^{-6} M en dimetil sulfóxido (DMSO) y solución balanceada de Hank's, la cual fue guardada a -70°C . Al momento de usarlo se hicieron diluciones 4.5×10^{-7} M y 4.5×10^{-8} M en PBS.

En cajas de Petri de plástico (60 X 11 mm), se depositaron 6 ml de una solución de agarosa tipo II al 1% en agua destilada y deionizada, medio esencial mínimo 2X suplementado con L-glutamina, Hepes 0.01 M y 10% de una mezcla de sueros humanos inactivados a 56°C durante 30 minutos. Las cajas se colocaron a 4°C por 30 minutos para incrementar la solidificación de la agarosa. Luego se hicieron 6 filas de 3 pozos de 3 mm de diámetro cada uno y con 3 mm de separación entre ellos; se eliminó la humedad de cada pozo.

En el pozo exterior se colocaron 10 ul del factor quimiotáctico, en el pozo del centro 10 ul de la suspensión de células (5×10^6) y en el pozo interno 10 ul de la solución de Hank's. Las cajas se incubaron a 37°C durante dos horas y media y luego se les añadió 5 ml de glutaraldehído al 2.5% en PBS para fijar las células y se dejó a 4°C hasta el día siguiente; se procedió luego a retirar la agarosa y a colorear las células con Wright. Cada experimento se realizó por triplicado.

Durante el proceso de estandarización de la técnica fue necesario averiguar cuál era la concentración adecuada del factor quimiotáctico para realizar la prueba. Utilizando tres concentraciones de FMLP encontramos un Diferencial Quimiotáctico que variaba dependiendo de la concentración.

La lectura se hizo en un microscopio de luz con un ocular calibrado (micrómetro = 0,2 mm = 1 unidad) y un objetivo de 3.2/10. Se determinó la distancia recorrida por las células desde el borde del pozo hacia el factor quimiotáctico (A) y la distancia recorrida en ausencia de estímulo (B). Con estos dos valo-

res se calculó el Diferencial Quimiotáctico (A-B) (Figura 1).

Los datos se presenta como media + una desviación estándar. Las comparaciones entre medias se realizaron por el Test de Student.

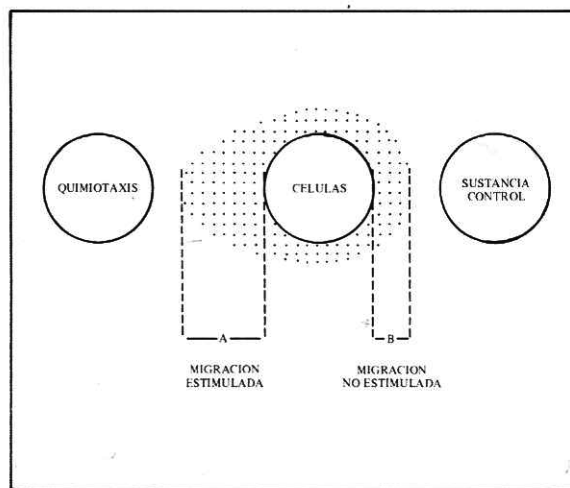


Figura 1. Principios de la técnica de migración bajo agarosa. El diferencial quimiotáctico es la diferencia de A y B.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra que con una concentración de FMLP de 4.5×10^{-8} M. se produce mayor estímulo quimiotáctico que con concentraciones de 4.5×10^{-6} M ($P < 0.001$)

Tabla 1. Quimiotaxis de PMNS utilizando diferentes concentraciones de FMLP.

Sujetos normales No.	Experimentos	Concentración FMLP	Diferenciales quimiotácticos* unidades
3	9	4.5×10^{-6} M	$3.18 \pm 1.64^{**}$
33	99	4.5×10^{-7} M	$3.52 \pm 1.31^{***}$
46	138	4.5×10^{-8} M	6.05 ± 1.87

* Media y desviación estándar

** $P < 0,001$

*** $P < 0,001$

y de 4.5×10^{-7} M ($P < 0.001$). En el histograma de la Figura 2 se aprecia que la mayoría de los experimentos por triplicado tienen un Diferencial Quimiotáctico entre 4.3 y 6.5 uni-

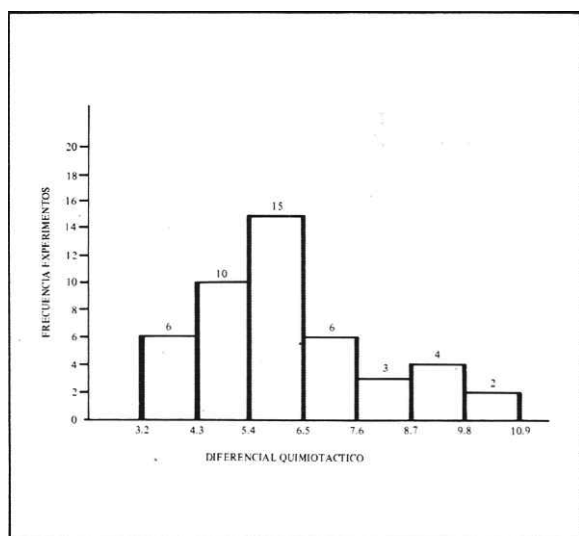


Figura 2. Distribución de 46 experimentos por triplicado controles. Quimiotaxis bajo agarosa de los PMN neutrofilos.

dades. Los valores controles obtenidos en 46 experimentos por triplicado fueron de 6.05 ± 1.87 U. para migración con factor quimiotáctico y de 3.10 ± 1.30 U. en la migración al azar.

La imagen microscópica característica de las migraciones de los polimorfonucleares neutrófilos, utilizando FMLP se muestra en la Figura 3.

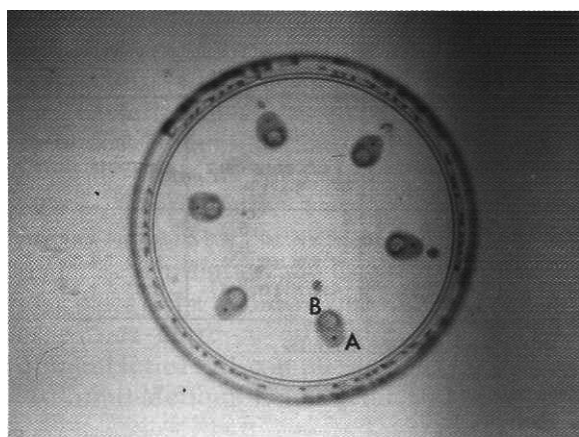


Figura 3. Aspecto macroscópico de la migración de los polimorfonucleares en caja de Petri. Zona A = quimiotaxis. Zona B = migración al azar.

En la Figura 4A se observa el patrón de la migración al azar; zona B con una longitud

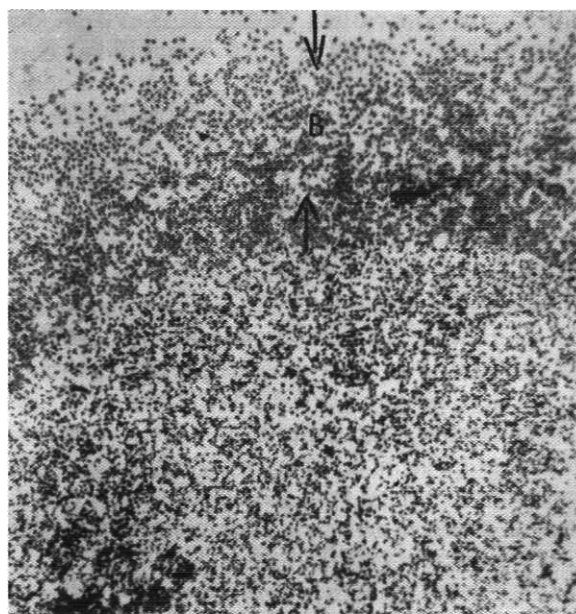


Figura 4A. Microfotografía (32X); se observa halo de migración espontánea, indicada por las flechas = zona B.

más corta, a partir del borde del pozo. La Figura 4B demuestra el patrón de la quimiotaxis, zona A, cuya longitud es mayor, a partir del borde del pozo. La Figura 5 es demostrativa de la morfología que adquieren las células

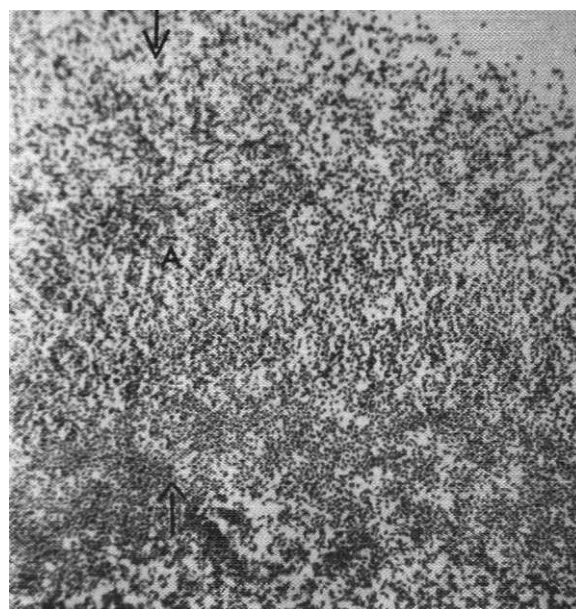


Figura 4B. Microfotografía (32X); se observa halo de migración quimiotáctica indicada por las flechas = zona A.

cuando reciben el estímulo quimiotáctico y empiezan a movilizarse. Se observan los detalles de las formaciones de pseudópodo anterior y de urópodo.

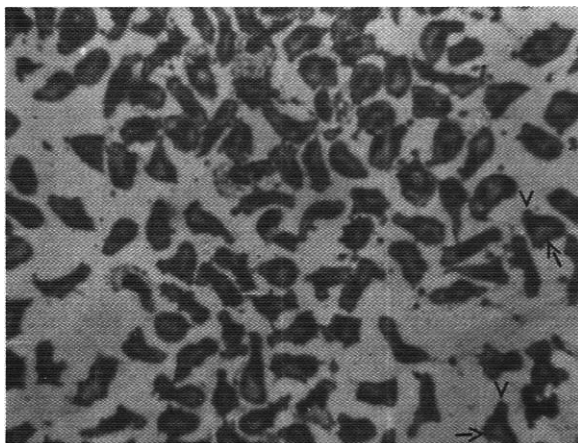


Figura 5. Aspecto microscópico de la migración de los polimorfonucleares. Aumento 400X. Se observa la morfología de las células fijadas. Las flechas indican el pseudópodo anterior y la V el urópodo.

DISCUSION

La medición de la actividad quimiotáctica de los polimorfonucleares neutrófilos utilizando el método bajo agarosa ha probado ser útil para la evaluación de la función de las células en pacientes con patología infecciosa recurrente o crónica con ciertas características (22) y para estudios experimentales (23, 24).

Con los resultados obtenidos por medio de la técnica modificada de Nelson y col. (20), pudimos estandarizar la quimiotaxis de neutrófilos bajo agarosa en nuestro laboratorio y comprobar que es reproducible y fácil de adaptar a nuestro medio en donde no siempre se dispone de reactivos de difícil consecución e incubadora de CO₂.

La medida de la quimiotaxis bajo agarosa también ofrece varias ventajas en comparación con la cámara de Boyden; es más rápida, fácil de cuantificar, requiere de pequeñas cantidades de sangre y se utiliza equipo desechable. Además está libre de las irregularidades que se encuentran utilizando niveles de líquido desiguales en dos cámaras o las variaciones de serie de los filtros. Así, con este método, tanto la quimiotaxis como la migración espontánea

de los polimorfonucleares neutrófilos y monocitos (20) se pueden distinguir y medir simultáneamente.

Hay que tener ciertas precauciones técnicas con esta técnica: Utilizar 10 unidades de heparina por ml; a pesar de que Nelson (20) usó 20 U/ml, nuestros resultados fueron óptimos con las dosis indicadas. Algunos autores (20) sugieren que el dextran puede inhibir la migración de las células; sin embargo nosotros utilizamos dextrán al 6% y encontramos que había una buena separación entre los glóbulos rojos y los leucocitos, sin alterar su movimiento. El uso de la solución de Hank's suplementada con gelatina al 0.1%, se recomienda para lavar y resuspender los neutrófilos, ya que con ella evitamos la agregación y la activación celulares. No creemos necesario el uso de antibióticos (penicilina, estreptomycin), puesto que el tiempo de incubación es sólo de 2.5 horas. Es crítica la presencia de L-glutamina en el medio de cultivo (medio esencial mínimo), como ha sido descrito (20). Con antelación habíamos visto (21) que no era necesaria la incubación en atmósfera de CO₂; si el pH del medio de cultivo se ajusta disminuyendo la concentración de NaHCO₃ y añadiendo un estabilizador como el Hepes hasta obtener un pH de 7.5, Repo y col. (25) habían sugerido que el CO₂ adicional no era indispensable si el pH del medio se ajustaba con concentraciones bajas de NaHCO₃. El número de células en cada pozo debe ser estandarizado ya que éste puede influir en la tasa de la migración espontánea. Utilizando 5×10^5 , encontramos una media y una desviación estándar de 3.10 ± 1.30 unidades. La cantidad de células que empleamos promueve una tasa de migración espontánea de 0.4 mm/hora (26). Es importante hallar la concentración óptima del factor quimiotáctico. Sabemos que concentraciones altas pueden inducir desactivación celular por saturación de los receptores (27) y las bajas inducen poco estímulo (28, 29). La concentración de FMLP que produjo el mayor Diferencial Quimiotáctico fue 4.5×10^{-8} M.

No tuvimos en consideración variables como sexo y edad puesto que no hay diferencias en la quimiotaxis de los neutrófilos

relacionadas con ellas (30). Con la estandarización de la quimiotaxis bajo agarosa de los polimorfonucleares neutrófilos (6.05 ± 1.87 U. Diferencial Quimiotáctico), podremos analizar el comportamiento de las células de los pacientes que presentan diversos tipos de infecciones recurrentes o crónicas.

SUMMARY

Chemotaxis of phagocytic cells toward inflammation sites is dependent on the generation of Chemotactic fragments from their respective complement precursors. The initiating reaction is the binding of antibody to the microbial surface. Complement is then activated and by cleavage yields Chemotactic fragments for both neutrophils and macrophages.

The growing number of patients reported in the literature with diseases related to Chemotactic deficiencies has prompted this study. The authors report the standarization of Nelson's modified technique in their laboratory and discuss its advantages and indications in clinical practice.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- RUDDY S, GIGLI I, AUSTIN KF. The complement system of man. *N Engl J Med* 1972; 287: 489-495.
- 2.- FERNANDEZ HN, HENSON PM, OTANI A, HUGLI TE. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphitoxins. I. Evaluation of C3a and C5a Leukotaxis in vitro under simulated in vivo conditions. *J Immunol* 1978; 120: 109.
- 3.- BECKER EL, WARD PA: Chemotaxis. En: PARKER C ed. *Clinical Immunology*. Philadelphia: WB Saunders' 1980: 272-297.
- 4.- SCHIFFMANN E, SHOWELL H, CORCORAN B, WARD PA, SMITH E, BECKER EL. The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factor from *Escherichia coli*. *J Immunol* 1975; 114: 1831-1837.
- 5.- SCHIFFMANN E, CORCORAN BA, ASWANIKUMAR S. Molecular events in the response of neutrophils to synthetic N-FMET chemotactic peptides demonstration of a specific receptor. En: GALLIN JI, QUIE PG eds. *Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implications*: New York. Raven Press; 1978: 97-111.
- 6.- SCHIFFMANN E, CORCORAN BA, WAHL SM. N-Formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1975; 72: 1059-1062.
- 7.- TURNER SR, LYNN SW. Lipid molecules as chemotactic factors. In *Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implications* New York: Raven Press; 1978: 289-298.
- 8.- GOETZL JE, PICKETT CW. Novel structural determinants of the human neutrophil chemotactic activity of leukotriene B *J Exp Med* 1981; 153: 482-487.
- 9.- KAPLAN AP, KAY AB, AUSTEN KF. A prealbumin activator of prekallikrein. III. Appearance of chemotactic activity, for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein. *J Exp Med* 1972; 135: 81-97.
- 10.- KAY AB, PEPTER DS, MCKENZIE R. The identification of fibrinopeptide B as a chemotactic agent derived from human fibrinogen. *Br S Haematol* 1974; 27: 669-677.
- 11.- WARD PA, REMOLD HG, DAVID JR. The production by antigen stimulated lymphocytes of a leukotactic factor distinct from migration inhibitory factor. *Cell Immunol* 1970; 1: 162-174.
- 12.- WASSERMAN SI, CENTER DM. The relevance of neutrophil chemotactic factors to a allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 64: 231.
- 13.- WARD PA, HILL JH. C5 chemotactic fragments produced by an enzyme in lysosomal granules of neutrophils. *J Immunol* 1970; 104: 535-543.
- 14.- REBUCK JW, CROWLEY JH. A method of studying leukocytic functions in vivo. *Ann NY Acad Sci* 59: 757-805.
- 15.- ADDISON IE, JOHNSON B, SHAW M. A human skin window technique using micropore membranes. *J Immunol Methods* 1982; 54: 129-139.
- 16.- OTANI A, HUGLI TE. Leukocyte Chemotaxis: A new in vivo testing technique. *Inflammation* 1977; 2: 67-82.
- 17.- BOYDEN SV. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453-466.
- 18.- ZIGMOND SH. The ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol* 1977; 75: 606-616.
- 19.- GALLIN JJ, CLARK RA, GOETZL EJ. Radioassay of Leukocyte Locomotion: A sensitive technique for clinical studies. En: GALLIN JJ, QUIE PG, eds. *Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and Clinical Implications*. New York: Raven Press; 1978: 79-86.
- 20.- NELSON RD, QUIE PG, SIMMONS RL. Chemotaxis Under Agarose: A new and simple method for measuring Chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol* 1975; 115: 1650.
- 21.- GARCIA, DE OD, ABRAMSON JS. A simplified under agarose method for measuring neutrophil Chemotaxis. *J Infect Diseases* 1983; 147: 1104.
- 22.- NELSON RD, McCORMACK RT, FIEGEL VC. Chemotaxis of Human Leukocytes Under Agarose. En: GALLIN JJ, QUIE PG, eds. *Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implications*. New York: Raven Press. 1978: 25-42.
- 23.- KOSUMEN TU. Use of leukocyte migration under agarose to study spontaneous and directed locomotion of leukocytes. *Immunology* 1978; 35: 539-548.
- 24.- REPO H, LEIRISALO M, KOSUMEN TU. Neutrophil Chemotaxis Under Agarose: A statistical analysis and comparison of the chemotactic response of cells from different donors. *J Immunol Methods* 1981; 46: 227-242.
- 25.- REPO H. Leukocyte Migration Agarose Test for the Assesment of Human Neutrophil Chemotaxis. I. Effects of environmental factors on neutrophil migration under agarose. *Scand J Immunol* 1977; 6: 203-209.
- 26.- RAMSEY WS. Locomotion of Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Exp Cell Res* 1972; 72: 489.
- 27.- ZIGMOND SH, SULLIVAN SJ, LAUFFENBURGER DA. Kinetic analysis of chemotactic peptide receptor modulation. *J Cell Biol* 1982; 92: 34-43.
- 28.- ZIGMOND SH, SULLIVAN SJ. Sensory adaptation of leukocytes to chemotactic peptides. *J Cell Biol* 1979; 82: 517-527.
- 29.- ZIGMOND SH. Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 1978; 77: 269-287.
- 30.- GLASSER L, FIEDERLEIN RL. Neutrophil migration under agarose: Quantitation and Variables. *Am J Pathol* 1979; 72: 956-962.