

Evidencias ultraestructurales de la liberación de enzimas lisosomales en cultivo de macrófagos expuestos a preparación de pared de estreptococo

T. MOISÉS Y C. FINLAY

*Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
Ciudad de la Habana, Cuba*

Recibido: 11 de enero de 1978

ABSTRACT. The capacity of macrophage in vitro to release selectively their lysosomal enzymes has been demonstrated in recent years. With the use of cytochemical reaction of acid phosphatase the lysosomal enzyme release could be demonstrated in macrophages which presented opened phagolysosomes with extracellular reaction product closely associated to plasma membrane. Our results showed that culture of mouse peritoneal macrophages exposed to group A Streptococcal Cell Wall Substance (PPG) release selectively their lysosomal enzymes. The enzyme release is minimal at one hour of beginning phagocytosis and was evident at 3 hours later.

RESUMEN. La liberación selectiva de enzimas lisosomales in vitro en macrófagos peritoneales ha sido demostrada en los últimos años. Mediante el uso de la reacción citoquímica para la fosfatasa ácida se pudo demostrar la liberación selectiva de enzimas lisosomales en macrófagos los cuales presentaron fagolisosomas abiertos con producto de reacción extracelular estrechamente asociado a la membrana plasmática. Nuestros resultados mostraron que los macrófagos peritoneales expuestos a pared de estreptococo grupo A (PPG) liberan selectivamente sus enzimas lisosomales siendo esta mínima una hora después de la fagocitosis y evidente 3 horas después.

INTRODUCCION

La capacidad de algunos tipos de células para liberar selectivamente sus enzimas lisosomales ha sido observada en situaciones fisiológicas y patológicas. La remodelación ósea inducida por la hormona paratiroidea (Vaes, 1969) es un ejemplo de liberación extracelular fisiológica y la liberación de grandes cantidades de proteasa ácida en cultivos de rudimentos óseos tratados con antisuero y complemento (Dingle y cols., 1969) es un ejemplo de liberación patológica.

Ha sido demostrada por métodos bioquímicos la exocitosis selectiva de hidrolasas lisosomales en cultivos de macrófagos tratados con zimozán (*Weissman y cols.*, 1971), inmunocomplejos (*Cardella y cols.*, 1974), asbestos (*Davies y cols.*, 1974a) y preparaciones de estreptococo (*Davies y cols.*, 1974b). En neutrófilos se han presentado varias evidencias morfológicas de exocitosis (*Henson*, 1971; *Hawkins y Peeters*, 1971), mientras que sólo conocemos de un reporte ultraestructural sobre exocitosis en macrófagos alveolares (*Ackerman y Beebe*, 1974) expuestos a zimozán, no habiéndose realizado en este estudio ninguna demostración citotóxica que permita una mejor visualización de dicho proceso.

El objetivo de este trabajo es presentar evidencias morfológicas y químicas de la exocitosis selectiva de enzimas lisosomales inducida por preparaciones de pared de estreptococo con determinaciones bioquímicas realizadas en cultivos paralelos.

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación. Se emplearon ratones suizos de ambos sexos y peso alrededor de 25 g. Los animales fueron suministrados por el bioterio del CENIC.

Obtención y cultivos de macrófagos. Se empleó el mismo procedimiento que hemos reportado anteriormente (*Finlay y cols.*, 1975) con algunas modificaciones. La cavidad peritoneal de ratones muertos por inhalación de cloroformo se lavó con medio 199 (Burroughs Wellcome) conteniendo antibióticos y heparina. Se depositaron 5 ml del líquido colectado en cada placa de Petri. Después de incubarlos a 37 grados C en atmósfera al 5% de CO_2 durante unas 18 horas, se aspiró el medio de cultivo lavándose la capa de células con solución salina y antibióticos. Después de 24 horas de incubación se aspiró el medio y se añadió medio de igual composición, conteniendo también 25 ug.ml^{-1} de PPG, 24 horas más tarde se terminó el experimento aspirando el medio de cultivo lavando la capa de células con ClNa 0.85% y procesando las células para microscopia electrónica o determinaciones enzimáticas.

Determinaciones enzimáticas. Se realizaron determinaciones enzimáticas al medio de cultivo de cada placa de Petri y al homogeneizado celu-

lar obtenido, añadiendo a las placas una solución de ClNa 0.85% conteniendo tritón X-100 al 0.1% y posteriormente se rasparon con un tapón de goma de silicón. Las determinaciones se efectuaron en condiciones que permitieron la liberación lineal de los productos de la reacción con respecto al tiempo de incubación y a la cantidad de muestra empleada.

La actividad de la B galactosidasa (B Gal) se determinó por el método de Conchie y cols. (1959). El sustrato empleado fue el P-Nitrofenil B-D Galactopiranosido (Koch Ligth). La actividad de la N-Acetil B-D Glucosaminidasa (N. Ac. Glu) se determinó por el método de Woolen y cols. (1961). El sustrato utilizado fue P-Nitrofenil-2 Acetamido-2 desoxy-B-D-Glucopiranosido (Koch Light) disuelto en tampón citrado 0.1 M. En ambos casos expresamos la actividad en nM de producto liberado h^{-1} placa $^{-1}$.

Los tiempos de incubación y demás condiciones fueron similares a las empleadas anteriormente (Finlay y cols., 1975).

La actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH) se determinó midiendo la velocidad de oxidación del nicotinamida adenindinucleótico reducido a 340 nM, siguiendo exactamente las instrucciones del Biochemical LDH test combination de la Boheringer. Expresamos los resultados en mU. placa $^{-1}$.

En los experimentos donde realizamos determinaciones enzimáticas se utilizaron 4 placas de Petri por concentración de PPG.

Preparación de pared de estreptococo (PPG). La preparación de pared de estreptococo nos fue suministrado por Davies preparada según el método descrito por Schwab (1965).

Análisis estadístico. Se expresaron los resultados por las medias y la desviación standard de cada grupo. Se utilizó el test "t" de student previa comprobación de homogeneidad de las varianzas para buscar las diferencias significativas entre los grupos.

Estudio al M.E. de los macrófagos. De cada tiempo de incubación se tomaron 2 placas de Petri y las células adheridas al vidrio fueron lavadas

una vez con solución salina fisiológica a 37 grados C, se fijaron inmediatamente en Glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1 M durante una hora a 4°C. Después de lavarse durante una noche las células fueron desprendidas mecánicamente con un tapón de goma siliconada y centrifugadas a 2,500 r.p.m. durante 15 minutos. Después de obtenido el pellet se dividió en dos porciones, una de ellas se post-fijó en O_3O_4 al 1% en tampón cacodilato durante 30 minutos a 4°C. Después de lavados en tampón cacodilato se sometieron a un baño de uranilo al 0.5% en tampón veronal-Acetato pH 5 a temperatura ambiente durante 30 a 45 minutos, se lavaron rápidamente en sucrosa fría al 7.5% (tres lavados), se deshidrataron pasándose por concentraciones crecientes de alcohol etílico y luego en óxido de propileno incluyéndose finalmente en epón 812 (Luft, 1961).

Demostración de la fostatasa ácida para M.E. de los macrófagos.

La otra porción del pellet correspondiente a cada tiempo de incubación fue fijada en Glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1 M durante una hora a 4°C. Se lavaron durante una noche en tampón cacodilato y se incubaron con el medio de Novikoff (Cytidine 5'monophosphate, CMP) con sucrosa al 5% durante una hora (Novikoff, 1963). Se lavaron tres veces en sucrosa fría al 7.5%, se post-fijaron en tetraóxido de osmio al 1% en tampón cacodilato durante 30 minutos y se lavaron varias veces en sucrosa fría al 7.5%. Seguidamente se sometieron a un baño de uranio al 0.5% en tampón Veronal-Acetato pH 5 a temperatura ambiente durante 30 a 45 minutos, se lavaron rápidamente en sucrosa fría al 7.5% (tres lavados), se deshidrataron pasándose por concentraciones crecientes de alcohol etílico, óxido de propileno, e incluyéndose finalmente en epón 812 (Luft, 1961).

Todos los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo LKB Ultratome III montándose secciones plateadas sobre rejillas de 400 mesh sin membrana soporte. El post-contraste se realizó con Uranil Acetato saturado en alcohol metílico y posteriormente en Citrato de Plomo según Reynolds (1963) y las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico Hitachi HS-7.

RESULTADOS

Determinaciones enzimáticas. Las dos enzimas lisosomales estudiadas se incrementaron significativamente ($P < 0.001$) en el medio extracelular a las dos horas de haberse añadido a los cultivos $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ la PPG, y el incremento fue mayor a la tercera hora.

Los niveles enzimáticos de la LDH en el medio extracelular no aumentaron durante todos los experimentos.

La actividad enzimática intracelular se mantuvo esencialmente igual durante el experimento. (Tabla I).

TABLA I

Tiempo en horas	β Galactosidasa		N-Acetil β -D Glucosaminidasa		Deshidrogenasa Láctica	
	Células	Medio	Células	Medio	Células	Medio
0	5.71 ± 1.99	0	1059.14 ± 183.60	8.93 ± 0	136.09 ± 13.42	0
1	$14.36 \pm 2.09^*$	0	1328.11 ± 315.95	$89.28 \pm 15.46^*$	169.33 ± 33.24	0
2	5.95 ± 1.53	$2.65 \pm 0.83^*$	1214.28 ± 573.53	$227.48 \pm 58.43^*$	150.34 ± 22.15	0
3	7.32 ± 5.97	$14.36 \pm 6.73^*$	989.95 ± 201.34	$589.28 \pm 137.36^*$	148.75 ± 15.07	0

Actividad enzimática de macrófagos cultivados en presencia de preparación de pared de estreptococo A. Se le añadieron $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de PPG a cultivos de 24 horas de macrófagos peritoneales de ratones. A partir de entonces y cada hora después se sacaron 4 placas para determinaciones enzimáticas. La actividad de las enzimas lisosomales se expresa en nM de producto liberado $\text{h}^{-1} \text{placa}^{-1}$. La actividad de la LDH en $\mu\text{u} \cdot \text{placa}^{-1}$. La actividad en los medios es la obtenida después de restar a cada medio la actividad de los medios de cultivo incubados en iguales condiciones sin células.

* $P < 0.001$

Estudio Ultraestructural. Las células lavadas y fijadas inmediatamente después de la adición de PPG no presentaron ninguna evidencia de fagocitosis. Estos macrófagos cultivados durante 48 horas presentaron un núcleo irregular con la cromatina rechazada hacia la membrana nuclear. El citoplasma abundante mostró un número variable de filopodias, mitocondrias variables en número y tamaño, un aparato de Golgi desarrollado, centriolos, gránulos densos de diversos tamaños y algunos cuerpos translúcidos (semejantes a vacuolas conteniendo lípidos). El retículo endoplasmático rugoso se observó como canales de luz estrecha siendo muy escaso en la mayoría de las células.



Fig. 1. Macrófago peritoneal una hora después de la exposición a la preparación de pared de estreptococo. Se observa PPG (flecha) cerca de la membrana plasmática rodeada de la misma. 7,846 x.

Los macrófagos fijados a la hora de haberse añadido la PPG presentaron algunos de ellos PPG cerca de la membrana plasmática y rodeado de filopodias. La PPG se observó como estructuras filamentosas, arrolladas electrondensas, y en las células incubadas para la demostración de la fosfatasa ácida se demostró producto de reacción asociado a dicho material (Fig. 1). Otros macrófagos contenían PPG en el interior de vacuolas sin producto de reacción así como vacuolas conteniendo PPG y produc-

to de reacción (Fig. 2). A las tres horas se observaron células con vacuolas abiertas al medio extracelular conteniendo PPG y producto de reacción (Figs. 3 y 4), no observándose la ruptura de los bordes membranosos que pudiera falsear la interpretación morfológica.

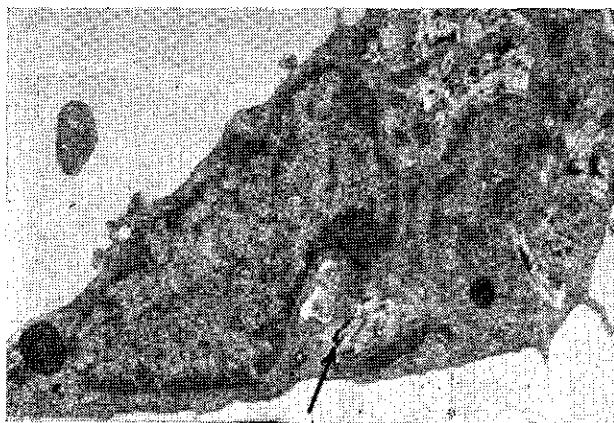


Fig. 2. Macrófago peritoneal una hora después de la exposición a la preparación de pared de estreptococo. Se observa PPG y producto de reacción (flecha) en varios fagolisosomas. 7,846 x.

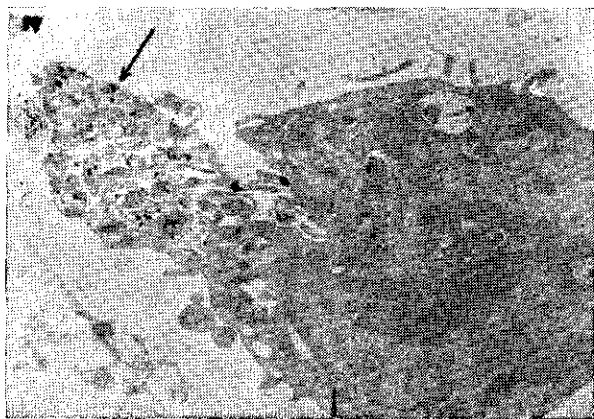


Fig. 3. Macrófago peritoneal tres horas después de la exposición a PPG. Se observa un fagolisosoma abierto con PPG y producto de reacción (flecha) en medio extracelular. 2,307 x.



Fig. 4. Macrófago peritoneal tres horas después de la exposición a PPG. Se observa un fagolisosoma abierto conteniendo PPG y producto de reacción en forma de numerosos gránulos. 14,769 x.

DISCUSION

La liberación extracelular de enzimas lisosomales es indispensable para que se produzca daño tisular, mediado por hidrolasas lisosomales. Varios modelos experimentales se han utilizado para estudiar la inflamación crónica inducida por estreptococo A. (Ginsburg, 1972). La PPG al ser inyectada subcutáneamente en conejos produce lesiones granulomatosas crónicas recurrentes (Ohanian y Schwab, 1967) también son capaces de inducir lesiones semejantes a la fiebre reumática en corazones de ratones (Ohanian y cols., 1969) y conejos (Rickles y cols., 1969), además causan poliartritis severas en ratas (Cromartie y cols., 1968). Davies y cols., (1974b) encontraron que PPG a concentraciones no tóxicas cuando son añadidas a cultivos de macrófagos peritoneales durante 24 horas inducen un incremento del tamaño de estas células, acompañado de un aumento significativo de la actividad intracelular de varias enzimas lisosomales y de la LDH, así como una liberación selectiva de parte de las enzimas lisosomales al medio extracelular. Ellos no aportaron evidencias ultraestructurales de este fenómeno.

Nuestros resultados experimentales confirman los hallazgos bioquímicos reportados por Davies y cols. (1974 b) evidenciado ya a la tercera hora de añadida la PPG un aumento significativo en el medio extracelular de las dos enzimas lisosomales estudiadas sin incremento de la LDH. También nuestros experimentos aportan datos ultraestructurales sobre el mecanismo de la exocitosis selectiva de enzimas lisosomales inducida por PPG en cultivos de macrófagos. Las fotos obtenidas demuestran vacuolas que contienen producto de reacción de fosfatasa ácida y PPG abiertas al medio extracelular. Estas células mantenían integridad ultraestructural. Nuestros resultados pueden deberse a que macrófagos que han fagocitado PPG mantienen abierta al medio extracelular la vacuola que contiene la PPG después que se ha fusionado con un lisosoma, también es posible que en un lisosoma secundario que contiene PPG al unirse a una nueva vacuola fagocítica vierta al medio extracelular parte del contenido enzimático; por último, es también posible que la PPG actúe sobre la membrana lisosomal determinando que se fusione con la membrana plasmática.

Los experimentos que hemos realizado no nos permiten determinar inequívocamente si una de estas alternativas prima sobre las demás o si ocurren varias de ellas al unísono. Nuestros resultados nos permiten demostrar que no se trata de movimiento de lisosomas primarios hasta fusionarse con la membrana plasmática como en el caso del modelo empleado por Hawkins y Peeters (1971), al estudiar la exocitosis selectiva de enzimas lisosomales en polimorfonucleares ni que la liberación enzimática obtenida es consecuencia de muerte celular.

REFERENCIAS

- ACKERMAN N. R. AND BEEDE J. R. Release of Lysosomal Enzymes by Alveolar Mononuclear Cells. *Nature*, 247, 475, 1974.
- CARDELLA C. J., DAVIES P. AND ALLISON A. C. Immune complex induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages. *Nature*, 247, 46, 1974.
- CONCHIE J., FINLAY J. AND LEVY G. A. Mammalian glycosidase: distribution in the body. *Biochem J.*, 17, 318, 1959.
- CROMARTIE W. J., CRADDOCK J. E. AND SCHWAB J. H. Production of chronic arthritis in rats with group A streptococcal cellular components. *Fed. Proc.* 27, 477, 1968.

Nuestros resultados experimentales confirman los hallazgos bioquímicos reportados por Davies y cols. (1974 b) evidenciado ya a la tercera hora de añadida la PPG un aumento significativo en el medio extracelular de las dos enzimas lisosomales estudiadas sin incremento de la LDH. También nuestros experimentos aportan datos ultraestructurales sobre el mecanismo de la exocitosis selectiva de enzimas lisosomales inducida por PPG en cultivos de macrófagos. Las fotos obtenidas demuestran vacuolas que contienen producto de reacción de fosfatasa ácida y PPG abiertas al medio extracelular. Estas células mantenían integridad ultraestructural. Nuestros resultados pueden deberse a que macrófagos que han fagocitado PPG mantienen abierta al medio extracelular la vacuola que contiene la PPG después que se ha fusionado con un lisosoma, también es posible que en un lisosoma secundario que contiene PPG al unirse a una nueva vacuola fagocítica vierta al medio extracelular parte del contenido enzimático; por último, es también posible que la PPG actúe sobre la membrana lisosomal determinando que se fusione con la membrana plasmática.

Los experimentos que hemos realizado no nos permiten determinar inequívocamente si una de estas alternativas prima sobre las demás o si ocurren varias de ellas al unísono. Nuestros resultados nos permiten demostrar que no se trata de movimiento de lisosomas primarios hasta fusionarse con la membrana plasmática como en el caso del modelo empleado por Hawkins y Peeters (1971), al estudiar la exocitosis selectiva de enzimas lisosomales en polimorfonucleares ni que la liberación enzimática obtenida es consecuencia de muerte celular.

REFERENCIAS

- ACKERMAN N. R. AND BEEDE J. R. Release of Lysosomal Enzymes by Alveolar Mononuclear Cells. *Nature*, 247, 475, 1974.
- CARDELLA C. J., DAVIES P. AND ALLISON A. C. Immune complex induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages. *Nature*, 247, 46, 1974.
- CONCHIE J., FINLAY J. AND LEVY G. A. Mammalian glycosidase: distribution in the body. *Biochem J.*, 17, 318, 1959.
- CROMARTIE W. J., CRADDOCK J. E. AND SCHWAB J. H. Production of chronic arthritis in rats with group A streptococcal cellular components. *Fed. Proc.* 27, 477, 1968.

- DAVIES P. C., ALLISON A. C., ACKERMAN J., BUTTERFIELD A. AND WILLIAMS S. Asbestos induces selective release of lysosomal enzymes from mononuclear phagocytes. *Nature*, 251, 423, 1974.
- DAVIES P., PAGE R. C. ALLISON A. C. Changes in cellular enzyme levels and extracellular release of lysosomal hydrolases in macrophages exposed to group A streptococcal cell wall substance. *J. Exp. Med.*, 139, 1262, 1974.
- DINGLE J. T., FELL H. B., AND GLAUERT A. M. Endocytosis of sugars in embryonic skeletal tissues in organ culture. IV. Lysosomal and other biochemical effects: general discussion. *J. Cell. Sci.*, 4, 139, 1969.
- FINLAY C., DAVIES P., ALLISON A. C. Changes in cellular enzyme levels and the inhibition of selective release of lysosomal hydrolases from macrophages by indomethacin. *Agents and actions*, 5, 345, 1975.
- GINSBURG I. Mechanism of cell and tissue injury induced by Group A. Streptococci. Relation to post streptococcal sequelae. *J. Infect. Dis.*, 126, 294, 1972.
- HAWKINS D. AND PEETERS S. The response of polymorphonuclear leukocytes to immune complexes in vitro. *Lab. Invest.* 24, 483, 1971.
- HENSON P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. II Mechanism of release during phagocytosis and adherence to nonphagocyt-able surface. *J. Immunol.*, 107, 1547, 1971.
- LUFT J. K. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 409, 1961.
- NOVIKOFF A. B. Lysosomes in the physiology and pathology of cells: Contributions of staining methods. In Ciba Foundation Symposium on Lysosomes (De Reuck A. V. S. and Cameron M. P. eds), Little, Brown and Co., Boston, 36, 1963.
- OHANIAN S. H., SCHWAB J. H. AND CROMARTIE W. J. Relation of rheumatic like cardiac lesions of the mouse to localization of group A streptococcal Cell Walls. *J. Exp. Med.*, 129, 37, 1969.
- OHANIAN S. H. AND SCHWAB J. H. Persistence of group A streptococcal cell walls related to chronic inflammation of rabbit dermal connective tissue. *J. Exp. Med.*, 115, 1137, 1967.
- REYNOLDS E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208, 1963.
- RICKLES N., ZILBERSTEIN Z., KRAUS S., ARAD G., KAUFSTEIN M., AND GINSBURG I. Persistence of Group A streptococci labeled with fluorescence isothiocyanate in inflammatory sites in the heart and muscle of mice and rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131, 525, 1969.
- SCHWAB J. H. Biological properties of streptococcal cell wall particles. I. Determination of the chronic nodular lesion of connective tissue. *J. Bacteriol.*, 90, 1405, 1965.

- VAES G. Lysosomes and the cellular physiology of bone resorption In Lysosomes in Biology and Pathology J. T. Dingle and H. B. Fell editors. North Holland. Pub. Co. I.: 217, 1969.
- WEISSMANN G., ZURIER R. B., SPIELER P. J. AND COLDSTEIN I. R. Mechanism of Lysosomal enzyme release from leukocytes expose to immune complexes and other particles. *J. Exp. Med.*, 134, 149, 1971.
- WOOLEN J. W., HEYWORTH AND WALKER P. G. Studies on glucosaminidasa and N-Acetyl-B-Galactosaminidasa. *Biochem. J.*, 78, 111, 1961.