

Potenciales de membrana en células mononucleares fagocíticas

M. NOA, B. DÍAZ Y J. KOURÍ

*Lab. Microscopia Electrónica y Fisiología Cardiovascular
del Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
La Habana, Cuba*

Recibido: 11 de diciembre de 1975

Recibido: 2 de julio de 1976

ABSTRACT. A study is made of the potentials of the membrane of the mononuclear phagocyte cells of peritoneal cavity of Wistar rats, obtained by implanting a ionoagar slides on a sterile teflon disc. The cells were selected using an optical microscope with attached micro-manipulator. Differences in potential of from 8 to 30 mv. are registered with an average of 13,47 mv. when glass microelectrodes full of CIK 3M are introduced in the agar slides with cells. It is concluded that the differences in the potentials observed may correspond to membrane potentials of mononuclear cells.

RESUMEN. Se realiza un estudio de los potenciales de membrana de las células mononucleares fagocíticas de la cavidad peritoneal de ratas Wistar obtenidas mediante la implantación de un disco de teflón estéril con una placa de ionoagar. Las células fueron seleccionadas mediante el empleo de un microscopio óptico con micromanipulador asociado. Se registran diferencias de potenciales de 8 a 30 mv, con una media de 13.47 mv al introducir microelectrodos de vidrio llenos de CIK 3M en las placas de agar con células. Se concluye que las diferencias de potenciales observadas pueden corresponder a potenciales de membrana de células mononucleares fagocíticas.

INTRODUCCION

Se han realizado numerosos estudios de los potenciales de transmembrana en células cuyo grado de excitabilidad no presentan el marcado desarrollo especializado propio de las células nerviosas y musculares, como son los realizados en glándulas salivares (Lundberg, 1958), células tiroideas (Woodbury y Woodbury, 1963), células de glándulas lagrimales

(Hisada y cols., 1964), hepatocitos de ratas (Schanne y Coraboeuf, 1966), células de las glándulas suprarrenales (Mathews, 1967) en células Hela (Borle y Loveday, 1968), en células L (Lam y Mc Kinnon, 1971) en fibroblastos de pulmón embrionario humano (Bard y Wright, 1974), y en células cebadas (Guschin y cols., 1973, 1974).

El estudio de los potenciales de membrana de células peritoneales se realizó por Cabrera y cols., (1971) a modo de reporte preliminar.

El objetivo de este trabajo es estudiar los potenciales de membrana en células mononucleares fagocíticas obtenidas de la cavidad peritoneal de ratas Wistar.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, de 150 a 200 g de peso, se les introdujo en la cavidad peritoneal un disco de teflón estéril constituido por un anillo exterior y otros dos interiores entre los cuales se colocó un cubreobjeto redondo, recubierto en una de sus caras de una placa de ionoagar de 2 mm de espesor preparado al 2% de solución Tyrode. Este disco se retiró a las 24 horas y se procedió a seleccionar las células mononucleares fagocíticas por eliminación de las demás. Para este procedimiento se utilizó un microscopio óptico Carl Zeiss (Ergaval) con micromanipulador asociado tipo Fonbrune, el que por medio de una micropipeta de 40 micras de diámetro en la punta, por succión nos permitió realizar la selección celular antes mencionada.

A la vez se estudió otro grupo celular sin selección previa, obteniéndose el disco de agar al tercer día de su implantación.

Posteriormente, el disco de agar con la población celular seleccionada y no seleccionada se colocó en una cámara de perfusión y registro electrofisiológico en solución Tyrode-Hoffman a 37°C burbujeada con carbógeno (oxígeno 95%, CO₂ 5%), se procedió a introducir en las células un microelectrodo de vidrio lleno de ClK 3M con punta menor de 0.5 micras de diámetro y con una resistencia de 20 a 50 Ohms, que estaba conectado mediante un seguidor catódico al circuito diferencial de entrada de un amplificador. Se realizó el registro eléctrico en un osciloscopio de rayos catódicos Biophase Alvar. Los potenciales se fotografiaron con una cámara quimográfica a toma fija. La calibración empleada fue de 1 cm igual a 20 mv.

Como controles se realizaron experimentos introduciendo el microelectrodo en placas de agar sin células y con células fijadas con glutaraldehído.

Se realizó el test de Student para la determinación de niveles de significación entre los dos grupos celulares estudiados.

RESULTADOS

En las muestras de agar desprovistas de células mononucleares fagocíticas la introducción del microelectrodo de vidrio a tanteo y repetición, no provocaba variaciones en la línea isoelectrica en la pantalla del osciloscopio.

Sin embargo, en el agar con células fue posible obtener el registro de potenciales eléctricos negativos estables, durante 1 a 6 minutos, con amplitudes promedio de $14.49 \text{ mv} \pm 0.62$ para una muestra de $n = 50$ en células seleccionadas, y amplitudes promedio de $12.20 \text{ mv} \pm 0.81$ para una $n = 40$ en células no seleccionadas.

Al realizar el test de la T no se encontraron niveles de significación entre los dos grupos celulares, siendo la amplitud promedio del potencial de reposo de 13.47 mv para una muestra de $n = 90$ y la S de 4.71. (Fig. 1).

Si se añadía glutaraldehído (fijador celular) a la preparación, en ambos grupos, desaparecía la diferencia de potencial descrita anteriormente.



Fig. 1. Demostración del potencial de reposo obtenido de una célula mononuclear fagocítica.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La cavidad peritoneal de las ratas fue escogida como fuente de células mononucleares fagocíticas por ser un compartimiento del cuerpo en el cual estos tipos celulares, involucrados en el proceso de inflamación aséptica son numerosos y de muy fácil obtención. (Fig. 2).

En el grupo celular de $n = 50$ estudiamos solamente células mononucleares fagocíticas, ya que la selección realizada nos permitió eliminar las células no deseables, quedándonos así con una población homogénea. (Fig. 3).

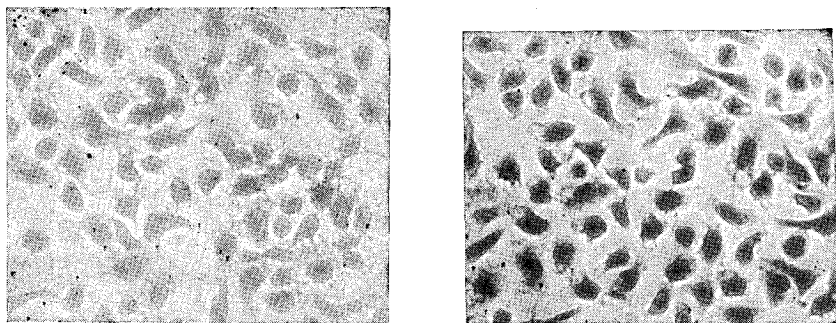


Fig. 2. Células mononucleares fagocíticas vistas al microscopio óptico, observándose la presencia de algunos Polimorfonucleares.

Fig. 3. Placa de agar seleccionada con células mononucleares fagocíticas.

En el grupo de $n = 40$ no se seleccionaron las células, pero como ha sido establecido (*Ancheta y Kouri, 1971*) al tercer día de implantación de cuerpos extraños en la cavidad peritoneal el mayor porcentaje de las células son mononucleares fagocíticas, decreciendo notablemente los neutrófilos.

Por lo anteriormente descrito y por no haber encontrado diferencias significativas en las magnitudes del potencial de reposo entre ambos grupos pensamos que estamos en condiciones similares de homogeneidad celular, discutiendo nuestros resultados como un muestreo único.

A pesar de que la técnica empleada no nos permitió la visualización directa del microelectrodo insertado en la célula, podemos indirectamente considerar que las variaciones de potenciales obtenidas se corresponden a las mismas, ya que como hemos referido en el agar desprovisto de células esto fue imposible de lograr. Además es importante señalar que la adición del glutaraldehído como fijador determinó la desaparición de estos potenciales.

El tiempo empleado en la micromanipulación selectiva de la población celular hubiese podido provocar una relativa anoxia, sin embargo pierde cierta importancia este inconveniente si consideramos los reportes de Pavillard y Rowlley, (1962); Nelson, (1969); Vernon-Roberts, (1972); los cuales señalaron que los macrófagos peritoneales obtienen su energía fundamentalmente de la glucólisis anaeróbica, consumiendo por tanto cantidades mínimas de oxígeno.

Otros autores han reportado valores promedio de potenciales de transmembrana obtenidos en células no excitables. Así, Borle y Loveday en 1968 reportaron valores promedios de -17.1 mv en células Hela; Lamb y Mac Kinnon en 1971 en células L de 15.4 mv; Guschin en 1973, obtiene en células cebadas valores promedio de 11.6 ± 0.48 ; también Bard y Wright en 1974, señalaron que en los fibroblastos de pulmón embrionario humano los valores de potenciales pueden oscilar entre 8.5 y 14.7 mv.

Nuestros resultados son similares en valores promedios a los reportados por estos autores.

Lo referido en el presente trabajo experimental y el hecho establecido de que toda célula viva muestra diferencia de potencial entre su interior y el exterior hacen totalmente posible el que se considere las variaciones de potencial obtenido como pertenecientes a las células mononucleares fagocíticas, aunque indiscutiblemente es necesario en estudios futuros la visualización celular con otros métodos complementarios que corroboren los criterios actualmente vertidos.

RECONOCIMIENTOS

Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a los Dres. I. Polunin y B. Holmgren por su gran colaboración en este trabajo; así como también a Héctor Leonard por su ayuda técnica, al Dr. Luis Herrera, Lic. Ma. del Carmen Almiñaque, Olga Arteaga y Rosa Izquierdo.

REFERENCIAS

- ANCHETA O. y KOURÍ J. Ultraestructura de la Inflamación Aséptica. *Revista CNIC*, 3, 111, 1971.
- BARD J. AND WRIGHT M.O. The membrane potentials of fibroblasts in Different Environments. *J. Cell. Physiol.* 84, 141, 1974.

- BORLE A.B. AND LOVEDAY J. Effects of temperature, potassium and calcium on the electrical potential difference in Hela Cells. *Cancer Res.* 28, 2401, 1968.
- CABRERA A., KOURI J., ANCHETA O., POLUNIN I. Reporte preliminar de la Electrofisiología de la Inflamación Aséptica. Libro de Resúmenes. III Seminario Científico del CNIC. Pág. 149, 1971.
- GUSCHIN I. S., ORLOV S. M. AND NATALIJA L. CZJU. Membrane Potential of mast cells and histamine release. *Bjull, eksper. biol (USSR) Nr. 11, 20, 1973.*
- GUSCHIN I. S., ORLOV S. M. AND NATALIJA L. CZJU. On the triggering mechanism of anaphylactic reactions in rat mast cells, *Allergologia et Immunopathologia.* Vol. II. Núm. 2. 1974.
- HISADA M. AND BOTELHO S.Y. Electrical properties of the membrane of in situ lacrimal gland cells in cats. *Fedn. Proc.* 23, 113, 1964.
- LAMB J.F. AND MAC KINNON M. G. The membrane potential and permeabilities of the L cell membrane to Na, K, and Chloride. *J. Physiol.* 213, 683, 1971.
- LUNDBERG A. Electrophysiology of salivary glands. *Physiol. Rev.* 38, 21, 1958.
- MATTEWS E.K. Membrane Potential measurement in cells of the adrenal gland. *J. Physiol.* 189, 139, 1967.
- NELSON D. S. Macrophages and Immunity. Editors: A. Neubreeger and E. L. Tatum. 1969.
- PAVILLARD E.R. AND ROWLLEY D. A Comparison of the Phagocytic and Bactericidal ability of guinea pig alveolar and mouse peritoneal macrophages. *Austral J. Exp. Biol.* 40, 207, 1962.
- SCHANNE O. AND CORABOEUF E. Potential and resistance measurements of rat liver cells in situ. *Nature, Lond.* 210, 1390, 1966.
- VERNON-ROBERTS B. The Macrophage Editors. R.J. Harrison and R.M. Mc Minn. 1972.
- WOODBURY D.M. AND WOODBURY J.W. Correlation of microelectrode potential recordings with histology of rat and guinea-pig Thyroid glands. *J. Physiol.* 169, 553, 1963.