

Patogenia de la Bagazosis. 1. Exocitosis selectiva de enzimas lisosomales de macrófagos alveolares inducida, in vitro, por polvo de bagazo

J. SARRACENT Y C. FINLAY

Dpto. de Bioquímica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba

Recibido: 26 de mayo de 1976

ABSTRACT. Bagasse powder induces selective release of three acid hydrolases: β -galactosidase, cathepsin D and N-Acetyl β -D-glucosaminidase when added to rabbit alveolar macrophage cultures 200 and 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of bagasse powder induce exocitosis of lysosomal enzymes in 24 hours cultures. The results presented in this paper could be relevant to the pathogeny of bagassosis.

RESUMEN. Macrófagos alveolares de conejo fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de polvo de bagazo durante 24 y 48 horas. Estas células a las 24 horas liberan selectivamente enzimas lisosomales cuando las concentraciones del polvo fueron 200 y 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$; a las 48 horas concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ causan muerte celular. Las enzimas estudiadas fueron cathepsina D, N-Acetil- β -D-glucosaminidasa y β -galactosidasa. La deshidrogenasa láctica se utilizó como marcador citoplasmático. Estos resultados sugieren que los macrófagos alveolares pueden ser un factor significativo en la patogenia de la bagazosis.

INTRODUCCION

La Bagazosis pertenece al grupo de enfermedades pulmonares llamadas alveolitis alérgicas extrínsecas (Akoun, 1974a, 1974b). Pepys en trabajos publicados en 1969 sugirió que ellas son causadas por un fenómeno de Arthus pulmonar. La histología de las lesiones de la bagazosis tanto humana (Buechner, 1967) como experimental (Smetana y cols., 1962; Gerstl y cols. 1949) no refuerzan esta hipótesis. En ambos casos la lesión fundamental es una neumonía intersticial difusa con predominio de células mononucleares y muy escasos polimorfonucleares.

A partir de 1971 se han publicado trabajos demostrando que tanto los

sin P.B. y placas con medio sin células ni P.B. Para los controles y cada concentración de P.B. se emplearon 4 placas. Terminamos el experimento aspirando el medio de cultivo, lavamos la capa celular con 4 ml de NaCl 0,9% a 37°C, le añadimos 2,5 ml de NaCl 0,9% con Triton x-100 y albúmina bovina, ambos a concentración final de 0,1%.

Desprendimos las células con ayuda de un tapón de goma de silicón. Realizamos determinaciones enzimáticas al medio de cultivos y al homogeneizado celular de cada placa.

Utilizamos polvo de bagazo recogido de una fábrica de papel a partir de bagazo que nos fue gentilmente suministrado por la Lic. Dalia Rojas. Tamizamos el polvo hasta obtener partículas de menos de 38 μm . En cada experimento utilizamos P.B. previamente esterilizado por autoclave. Momentos antes de añadirse a los cultivos los suspendimos en 10 ml de M-199 y los sonicamos a 1,8 amperes durante 3 minutos en un sonificador M.S.E.

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

Los sustratos fueron adquiridos en Koch-Light o Sigma. Las técnicas enzimáticas empleadas fueron las siguientes:

Deshidrogenasa láctica (L.D.H.) E.C. 1.1.1. 27.

Determinamos la velocidad de oxidación del nicotinamida adenin-dinucleótido reducido a 340 nm, siguiendo exactamente las instrucciones del Biochemical LDH test combination de la Boheringer.

Expresamos los resultados en $\text{mU} \cdot \text{placa}^{-1}$.

β galactosidasa (βgal) E.C. 3.2.1.23. Determinamos su actividad por el método de Conchie y cols., (1959). El sustrato empleado fue el p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido.

N-Acetil β -D-glucosaminidasa (N.Ac. Glu.) E.C. 3.2.1.30 empleamos el método de Woolen y cols. (1961). El sustrato utilizado fue p-nitrofenil-2-acetamido-2-deoxy- β -D-Glucopiranosido disuelto en tampón citrato 0,1 M.

En ambos casos expresamos la actividad en nm de producto liberado $\text{hr}^{-1} \cdot \text{placa}^{-1}$. Los tiempos de incubación y demás condiciones fueron los mismos empleados por Finlay y cols., (1975).

Catepsina-D, utilizamos el método de Anson, (1937). La unidad empleada corresponde a la cantidad de enzima que liberan en una hora, una can-

tividad de oligopéptidos, ácidos solubles que dan por el método de Lowry una intensidad de color equivalente a un μg de Albúmina bovina.

Análisis estadísticos.— Se expresan los resultados por la media y la desviación standard de cada grupo.

Se utilizó el test "t" de Student previa comprobación de homogeneidad en las varianzas.

RESULTADOS

Obtuvimos y cultivamos los macrófagos alveolares como describimos en materiales y métodos. Después de lavar las placas añadimos tres concentraciones diferentes de polvo de bagazo: 100, 200 y 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; 24 y 48 horas después terminamos los experimentos. Las determinaciones de LDH se realizaron el mismo día, el resto de las determinaciones enzimáticas se realizaron en los cuatro siguientes días a la terminación de los experimentos.

TABLA I

Acción de diferentes concentraciones de polvo de bagazo (P.B.) sobre los cultivos de macrófagos alveolares de conejo

Tiempo de cultivo (horas)	Concentración de P.B. ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Act. en células	Act. en medio
24	0	126.5 ± 10.35	37.9 ± 2.7
	100	$108.4 \pm 8.34^+$	39.24 ± 3.27
	200	$104.4 \pm 3.65^*$	39.29 ± 3.24
	400	85.4 ± 3.65	36.13 ± 2.48
48	0	120.2 ± 26.3	23.4 ± 1.2
	100	$77.0 \pm 10.5^+$	$37.9 \pm 9.6^{++}$
	200	$63.9 \pm 5.7^*$	$63.6 \pm 5.2^{**}$

La actividad de la LDH, un marcador citoplasmático se expresa tanto en el medio como en las células por mU placa^{-1} . Los resultados corresponden a la media y a la desviación standard de cada grupo de 4 placas. El test de "t" se refiere a cada concentración de P.B. comparada con el control a cada tiempo de cultivo. Estos resultados corresponden a un experimento.

$^+ P < 0.02$; $^{++} P < 0.025$; $^* P < 0.001$ $^{**} P < 0.001$

experimentos. Las muestras de los homogeneizados celulares y del medio se mantuvieron durante todo el tiempo a 4°C. Presentamos en este trabajo los resultados obtenidos en un experimento. Iguales resultados se obtuvieron en tres experimentos.

La actividad de las tres enzimas lisosomales estudiadas se incrementa significativamente en los medios de 24 horas, de los cultivos suplementados con P.B. a las concentraciones de 200 y 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. A la concentración de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ se incrementó significativamente la actividad de la β gal (Fig. 1) ($P < 0,001$) y catepsina D (Fig. 2) ($P < 0,02$). La N · AcGlu (Tabla I) a 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ incrementó su actividad pero no significativamente. La actividad de la LDH en el medio de estos cultivos no se incrementan, lo que indica liberación selectiva de enzimas lisosomales al medio de cultivo. A las 48 horas incrementa a 100 y 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ pero también a esas concentraciones incrementa la actividad de la LDH en el medio ($P < 0,025$ y $P < 0,001$ respectivamente) evidenciando muerte celular. Davies y cols., (1974) también reportaron muerte celular al cultivar macrófagos con fibras de asbestos durante 48 horas. Es posible que estas células carentes de suero sean más susceptibles a la acción tóxica de las partículas. La actividad de la catepsina D en las células disminuye en los cultivos con 200 y 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de P.B. ($P < 0,001$) y a iguales concentraciones también disminuye la β gal celular ($P < 0,025$ y $P < 0,01$ respectivamente). La actividad de la N. AcGlu celular no varía a ninguna de las concentraciones estudiadas en los cultivos de 24 horas. También la actividad de la LDH celular disminuye significativamente en todas las concentraciones de polvo de bagazo. Sin embargo sólo en cultivos de 48 horas es acompañada de un incremento extracelular.

Las observaciones morfológicas de los cultivos demuestran que las células sometidas a la acción del polvo de bagazo se redondean más que los controles y aumentan el número de vacuolas al incrementarse la concentración de polvo empleada. Estos datos, no incluidos en el presente trabajo, serán publicados próximamente (Finlay y Sarracent en preparación).

DISCUSION

En las más recientes revisiones sobre las alveolitis alérgicas extrínsecas (Morgan, 1974; Banaszak y Thiede 1974; Akoun 1974b) se le asigna un papel determinante en la patogénesis de la enfermedad al Termoactino-

mices vulgaris. Esto se debe a los hallazgos de Salvaggio y cols., (1969) que demostraron precipitinas en el suero de pacientes contra extractos de *T. vulgaris*; también Hearn y cols., (1968) encontraron que pacientes con bagazosis sometidos a la inhalación de extracto de *T. vulgaris* presentaban reacciones sistémicas y pulmonares pocas horas después de aspirar el extracto. Ninguno de estos investigadores sugieren participación de los macrófagos alveolares en la patogenia de este grupo de enfermedades. Allison y Davies, (1974) valoran esta posibilidad, aunque sin aportar datos experimentales.

TABLA II

Efecto de diferentes concentraciones de polvo de bagazo (P.B.) sobre la liberación selectiva de N-Acetyl-β-D. glucosaminidasa. Macrófagos alveolares de conejo cultivados a diferentes tiempos

Tiempo de cultivo (horas)	Concentración de P.B. ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Act. en células	Act. en medio
24	0	18888 \pm 2119.2	720.8 \pm 147.5
	100	18485.9 \pm 1819.1	953.1 \pm 152.9
	200	18180.3 \pm 1370.8	2050.8 \pm 172.0**
	400	16680.3 \pm 2163.0	3555.5 \pm 222.0**
48	0	16833.4 \pm 3155.3	930.1 \pm 245.9
	100	16249.8 \pm 481.1	2040.3 \pm 367.0**
	200	11180.4 \pm 1593.6**	4317.1 \pm 427.4**

El test de "t" se refiere a cada concentración de P.B. comparada con el control de un tiempo de incubación. Los resultados corresponden a un experimento. Empleamos cuatro placas para cada concentración de P.B. Los resultados corresponden a la media y la desviación standard.

** $P < 0.001$

Nuestros resultados demuestran que macrófagos alveolares de conejo, in vitro, son capaces en presencia de polvo de bagazo a concentraciones superiores a $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, de exocitar selectivamente una proporción significativa de sus enzimas lisosomales. Hemos evidenciado que tres hidrolasas ácidas se comportan de igual forma. Las partículas de polvo utilizadas no tenían un diámetro homogéneo. Nuestros métodos de separación

sólo nos permitieron emplear partículas con tamaño promedio inferior a 38 μ m. Es posible que de haber utilizado partículas de tamaño promedio inferior a 15 μ m hubiéramos obtenido una mayor liberación de enzimas lisosomales y evidenciarla a menores concentraciones de polvo. En trabajos reportados anteriormente (*Smetana y cols.*, 1962) se ha logrado reproducir experimentalmente la enfermedad con partículas de polvo de tamaño igual o algo mayores a las empleadas por nosotros.

Las células sometidas a la acción del polvo de bagazo se redondean y vacuolizan, estos cambios se incrementan al aumentar la concentración del polvo. La morfología de estas células nos sugiere que los macrófagos han fagocitado las partículas de polvo.

La ausencia de suero en el medio de cultivo elimina la posibilidad de que el sistema del complemento intervenga en la exocitosis que hemos demostrado. Las concentraciones de polvo de bagazo utilizadas por nosotros y otras todavía mayores, no hemolizan los glóbulos rojos de carnero, (observación personal) indicándonos que el contenido en sílice es insuficiente para explicar nuestros resultados. Es por lo tanto posible sugerir que la fagocitosis de polvo de bagazo per se, induce la exocitosis de enzimas lisosomales. Este hecho pudiera tener importancia en la patogenia de la bagazosis. En estos momentos estamos realizando experimentos para determinar el comportamiento en nuestro sistema de distintas fracciones de polvo de bagazo esterilizadas por auto clave, con el objetivo de conocer si la facultad de inducir exocitosis reside en alguna de ellas. Además, por ser nuestro modelo experimental sencillo iniciamos trabajos encaminados a estudiar este fenómeno en animales de experimentación pues el resultado de estos trabajos pudiera ser útil en la prevención de esta enfermedad, al aportar datos sobre la etiología de la enfermedad y el tipo de partícula que la causa.

RECONOCIMIENTOS

En el desarrollo de este trabajo se empleó parte de la colaboración recibida, en forma de reactivos y material de laboratorio de la C.U.S.O. El Dr. Segredo nos suministró B.C.G., los compañeros del Laboratorio de cultivo de tejido del CENIC, el M-199 y el suero bovino, el Cro. Nelson Díaz colaboró técnicamente en los experimentos. A ellos agradecemos su apreciada y eficiente cooperación.

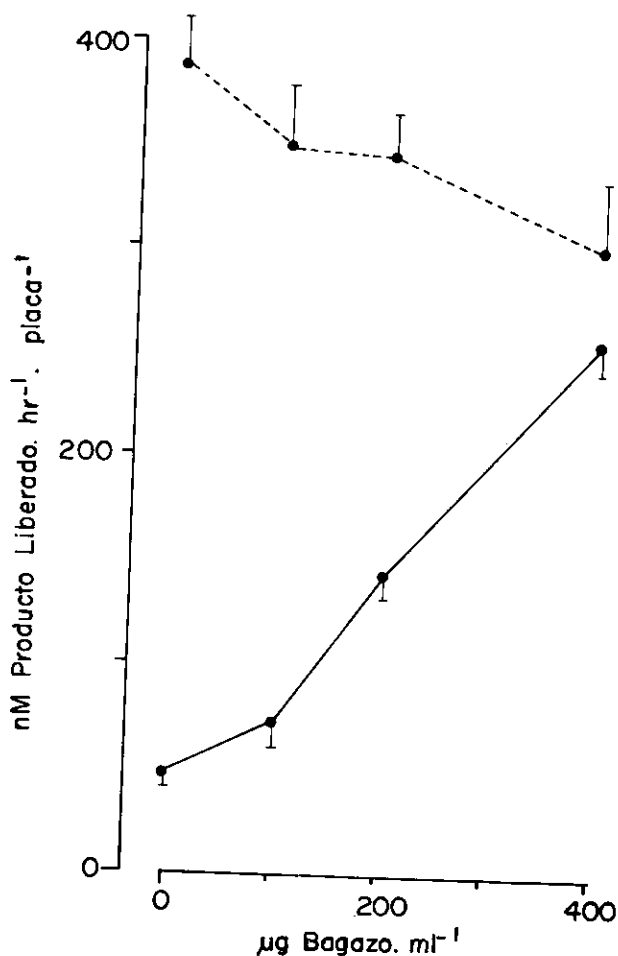


Gráfico 1. Acción de diferentes concentraciones de polvo de bagazo (P.B.) sobre la liberación selectiva de galactosidasa. Macrófagos alveolares de conejo cultivados durante 24 horas. Actividad en células — — — — y en medio —————. Cada punto expresa la media de 4 placas a cada una de las cuales se le hizo una determinación, y la barra su desviación standard. Estos resultados corresponden a un experimento.

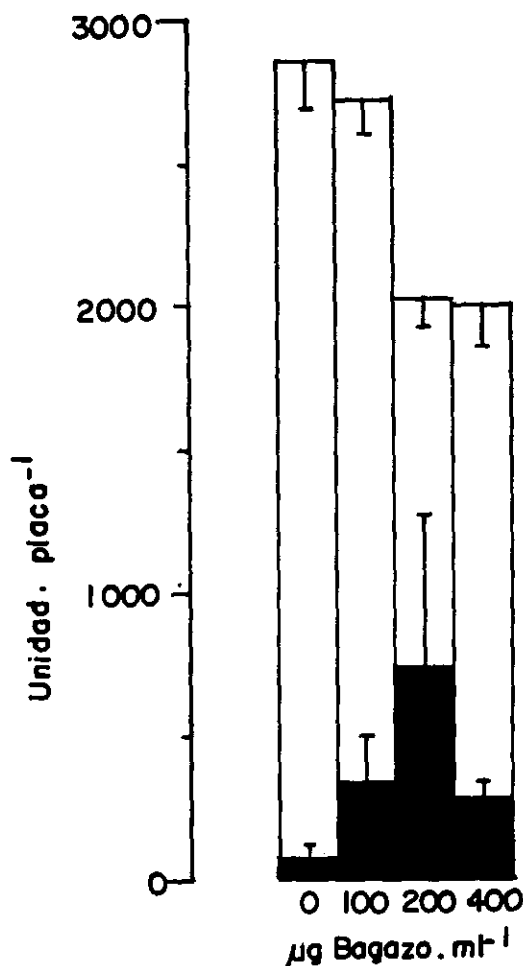


Gráfico 2. Acción de diferentes concentraciones de polvo de bagazo sobre la liberación selectiva de catepsina D. Macrófagos alveolares de conejo cultivados durante 24 horas. Las barras claras representan la media de la actividad de las células de 4 placas a cada una de las cuales se le hizo una determinación con su correspondiente desviación standard y las oscuras la media de la actividad en el medio de las mismas cuatro placas con sus correspondientes desviaciones standard.

REFERENCIAS

- ACKERMAN N.R. AND BEEKE J.R. Release of lysosomal enzymes by alveolar mononuclear cells. *Nature* 247, 475, 1974.
- AKOUN G. Les alveolitis allergiques extrinseques. 1-leurs aspects cliniques. *Sem. Hop. Paris*. 50, 2017, 1974a.
- AKOUN G. Les alveolitis allergiques extrinseques. 2-leurs aspects etiopatogeniques. *Sem. Hop. Paris*. 50, 2093, 1974b.
- ALLISON A.C. AND DAVIES P. Mechanisms underlying chronic inflammation. Ed. G.P. Velo, D.A. Willoughby, J.P. Giroud, Future trends in inflammation, 449. Piccin medical books, Padua y London, 1974.
- ANSON M.L. The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. *J. Gen. Physiol.* 20, 565, 1937.
- BANASZAK E.F. AND THIEDE W.H. Hypersensitivity pneumonitis. *Geriatrics* 29, 65, 1974.
- BUECHNER H.A. *Bagassosis*. *G. P.* 35, 108, 1967.
- CARDELLÁ C. J., DAVIES P. AND ALLISON A. C. Immune complexes induce selective release of acid hydrolases from macrophages. *Nature*, 247, 46, 1974.
- CONCHIE J., FINLAY J. AND LEVY G.A. Mammalian glycosidases. Distribution in the body. *Biochem. J.* 71, 318, 1959.
- DAVIES P., PAGE R.C., ALLISON A.C. Changes in cellular enzyme levels and extracellular release of lysosomal acid hydrolases in macrophages exposed to group A. Streptococcal cell wall substance. *J. Exp. Med.* 139, 1262, 1974.
- DAVIES P. ALLISON A.C., ACKERMAN J., BUTTERFIELD A. AND WILLIAMS S. Asbestos induces selective release of lysosomal enzymes from mononuclear phagocytes. *Nature* 251, 423, 1974.
- FINLAY C., DAVIES P. AND ALLISON A.C. Changes in cellular enzyme levels and the inhibition of selective release of lysosomal hydrolases from macrophages by Indometacina. *Agent and action*. 5, 235, 1975.
- GERSTL B., TAGER M. Szczepaniak. The pathogenicity of bagasse. II. Effect on rabbits of prolonged exposure to bagasse. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 70, 607, 1949.
- HEARN C. E. D. AND HOLFORD-STREVS, V. Immunological aspects of bagassosis. *Brit. J. Indust. Med.* 25, 283, 1968.
- MORGAN K.C. WM. Extrinsic allergic alveolitis. *Ann. Allergy* 33, 155, 1974.
- MYRVIK Q.N., LEAKE E.S. AND FARISS B. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit. A technique to procure them in a high state of purity. *J. Immunol.* 86, 128, 1961.

- PEPYS J. Hypersensitivity diseases of the lungs due to fungi and organic dusts. Ed. S. Karger, New York, Basel, 1969.
- SALVAGGIO J., AROUEMBOURG P., SEABURY J. AND BUECHNER H. Bagassosis. IV. Precipitins against extracts of thermophilic actinomycetes in patients with Bagassosis. *Ann. J. Med.* 46, 538, 1969.
- SMETANA H. F., TANDOR H. C., VISWANATHAN R., VENKITASUBRAMANIAN T. A., CHANDRASEKHAR S., RANDHAWA H. S. Experimental bagasse, disease of the lung. *Lab. Invest.* 11, 868, 1962.
- WEISSMANN G., DUROK P., ZURER R. B. Effect of cyclic AMP on release of lysosomal enzymes from phagocytes. *Nature. New Biol.* 231, 131, 1971.
- WOOLEN J. W., HEYWORTH R. AND WALKER P. G. Estudios on glucosaminidase and N-Acetyl B. D. galactosaminidase. *Biochem. J.* 78, 111, 1961.