

Aislamiento y caracterización de membrana plasmática de macrófago peritoneal de ratón

A. OTERO Y J. B. KOURÍ

Dpto. de Biología Celular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 15 de diciembre de 1980

Recibido: 16 de febrero de 1981

ABSTRACT. Macrophage plasma membrane represent an essential interest for study of main functions of this cell, for instance phagocytosis and in general for the role which it can play in Immune Response. We have developed a methodology for plasma membrane isolation of peritoneal cultured macrophages based in other experiences which consisted in its prefixing with an stabilizing agent, gently Dounce homogenization and purification in discontinuos buffered sucrose gradients. Fractionation was morphologically monitored. Plasma membrane showed between 35 — 45% on protein components and 6% carbohydrates, considering the dry mass of isolated fraction. This methodology allow to continue and extend studies of this organell which we have been carried out in our department.

RESUMEN. La membrana plasmática del macrófago presenta un marcado interés para el estudio de las funciones principales de esta célula como por ejemplo, la fagocitosis y en general por su papel en la Respuesta Inmune. Se presenta aquí una metodología para la obtención de membrana plasmática de macrófagos peritoneal cultivado de ratón basada en experiencias anteriores que consistió en la prefijación de ésta con un agente estabilizante, homogeneización en Dounce y purificación en gradientes discontinuos de sacarosa tamponada, siguiéndose un criterio de pureza estrictamente morfológico. La membrana plasmática mostró entre un 35 a 45% de proteínas y 6% de carbohidratos, partiendo de la masa seca de la fracción aislada. Esta metodología permite continuar y ampliar los estudios de este organelo que se han venido realizando en nuestro departamento.

INTRODUCCION

El papel del macrófago en los procesos inflamatorios e inmunológicos cada día cobra mayor importancia a la luz de los estudios en los que se ven involucrados los que han demostrado que esta célula interviene

en mecanismos más complicados que una simple actividad fagocítica (Dannember, 1975; Unanue, 1975).

La membrana plasmática de esta célula es un centro de atención inmediato debido a su importancia en los procesos de fagocitosis y mediación química y celular a través de sus receptores superficiales (Noa y Kouri, 1977; Ravinovich, 1970). En estos momentos se le considera como una expresión de diferenciación de la secuencia monoblasto de médula-monocito-macrófago tisular (Bianco y Edelson, 1978).

Se han realizado aislamientos de membrana plasmática de macrófago peritoneal de cobayo (Henon y cols., 1977; Remold-O'Donnell, 1977) y alveolar de conejo (Nachman y cols., 1971; Wang y cols., 1975) por fraccionamiento celular así como fraccionamiento analítico de macrófago peritoneal de ratón en el que se obtuvo una fracción microsomal heterogénea (Canonico y cols., 1978).

Con este trabajo nos proponemos, acopiando las experiencias anteriores, optimizar una metodología de aislamiento de membrana plasmática de macrófago peritoneal de ratón con el fin inmediato de determinar sus componentes mayores para posteriormente abordar el estudio de receptores superficiales de importancia inmunológica.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratones albinos del bioterio CENIC de aproximadamente 20 g de peso, preparándose cultivos de macrófagos peritoneales de acuerdo a lo reportado anteriormente (Cohn y Benson, 1965; Finlay y cols., 1975) con algunas modificaciones que rindieron pellets de aproximadamente 50×10^6 células en cada experimento de fraccionamiento, después de efectuar la cosecha según lo reportado para este tipo celular (Rabinovich y Destefano, 1976; Rodríguez, 1981). (Fig. 1).

La viabilidad de las células se controló por el test de exclusión con azul de tripan. Las células fueron preparadas para examen al microscopio electrónico según lo reportado (Otero y cols., 1981).

En un principio se ensayaron diferentes métodos de aislamiento desde la vesiculación con aldehídos (Scott, 1976), homogeneización clásica, hasta el método de obtención de fantasmas celulares (Warren y cols., 1966) adoptado definitivamente aprovechando la experiencia y modificaciones introducidas en células BHK-21 y HS5 (Lage y Montagnier,

1977) y puesto a punto con algunas variaciones como la introducción de un gradiente final discontinuo de sacarosa descrito en el aislamiento de membrana plasmática de macrófagos alveolares de conejo (*Wang y cols., 1975*).

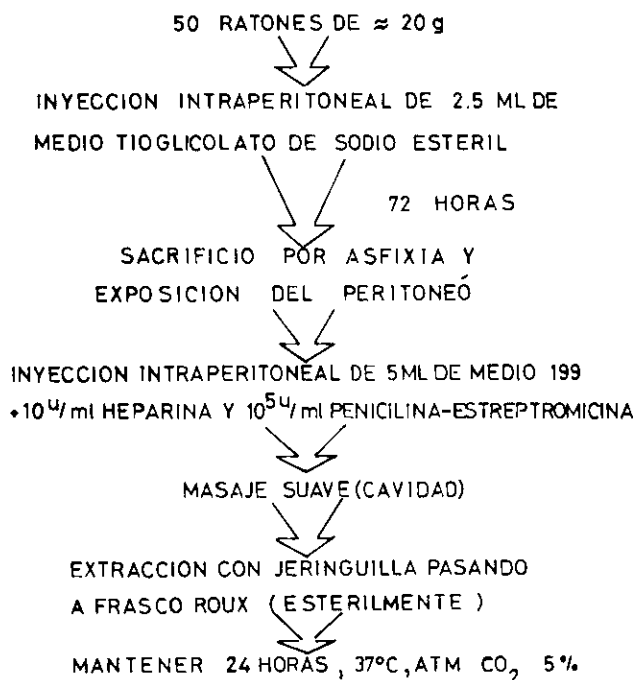


Fig. 1. Esquema del cultivo de macrófagos peritoneales de ratón.

El fraccionamiento fue monitoreado por microscopia de contraste de fase basándonos en el tamaño y forma de los fantasmas obtenidos de acuerdo a lo descrito para macrófago alveolar de conejo (*Nachman y cols., 1971*).

Partiendo de la fracción de membrana plasmática liofilizada y disuelta en tritón x-100 al 1% el contenido proteico fue estimado por el método de Lowry y cols. (*Lowry y cols., 1951*).

Los azúcares totales neutros se determinaron por la reacción de la antrona utilizando glucosa como patrón (*Williams y Chase, 1968*).

RESULTADOS Y DISCUSION

El esquema definitivamente adoptado se muestra en las Figs. 2a y 2b.

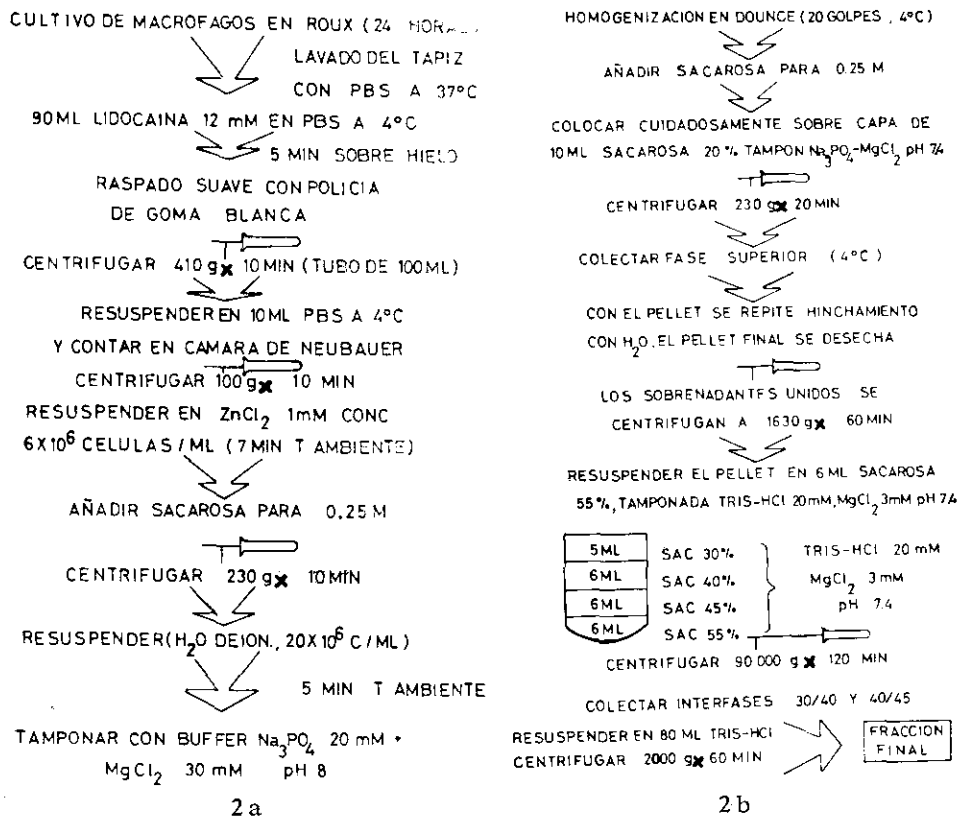


Fig. 2. Fraccionamiento de membrana plasmática de macrófago peritoneal de ratón.

Aunque el reporte original indica el tratamiento con lidocaina a temperatura ambiente (Rabinovich y Destefano, 1976), en nuestro caso resultó mejor cosechar las células a 4°C que según la literatura favorece el desprendimiento de la monocapa. (Figs. 3 y 4).

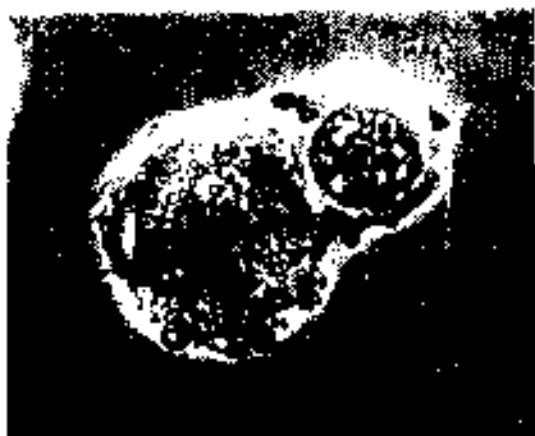


Fig. 3. Aspecto de las células en suspensión después de la cosecha (1720 x).

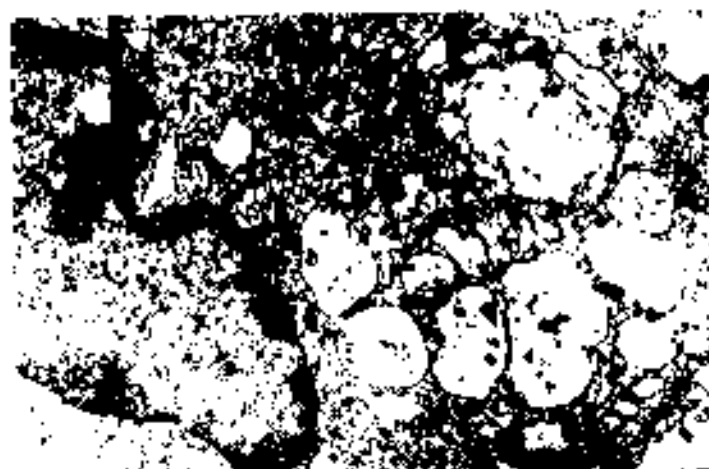


Fig. 4. Ultraestructura que muestra preservación después de la cosecha. Obsérvese los efectos del estimulante en el citoplasma (5400 x).

Tenemos evidencias en nuestro departamento que el raspado del tapiz celular con tapón blanco preserva la ultraestructura, lo cual fue comprobado en nuestro sistema. La viabilidad osciló entre un 80 y 85% en cada experimento.

La prefijación y el hinchamiento (Fig. 5) pudieron controlarse según los parámetros reportados así como la homogeneización que resultó productiva a la concentración celular indicada (6×10^6 de células/ml) aunque fue necesario estandarizar el número de golpes en el Dounce a nuestras condiciones.

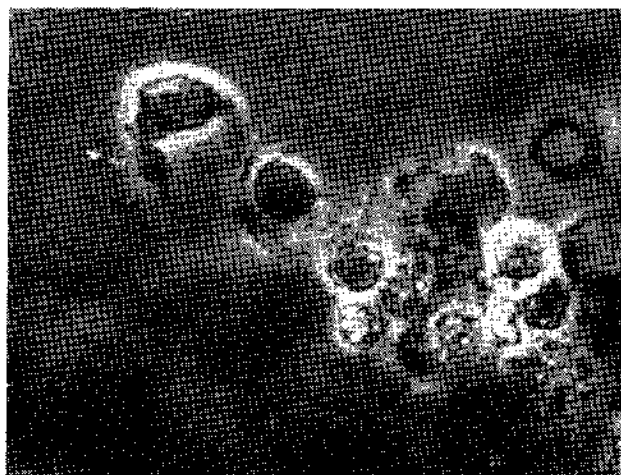


Fig. 5. Hinchamiento osmótico después de la prefijación con ZnCl_2 (720 x).

Asumimos a priori el coeficiente de sedimentación indicado para los fantasmas celulares (6×10^5 g/minutos) resultando satisfactorio ya que el sobrenadante mostró fundamentalmente fantasmas y otras vesículas y el pellet agrupó núcleos y células no rotas. (Figs. 6 y 7).

La variación final incluyó el tampón reportado en la metodología para células BEK-21 y HS5 (Lage y Montagnier, 1977) por parecernos más adecuado que el original (Wang y cols., 1975).



Fig. 6. Homogenato con fragmentos grandes de membrana plasmática, vesículas y debris celular. (720 x).



Fig. 7. Paso intermedio de la purificación de la membrana. (1440 x).

De los análisis químicos practicados a la fracción de membrana plasmática (Fig. 8) se desprende una composición mayor de proteínas que fluctúa entre 35 y 45% así como un 6% de carbohidratos (sin considerar hexosaminas) teniendo en cuenta el contenido lipídico por diferencia, lo que está de acuerdo con referencias anteriores (*Nachman y cols., 1971*).



Fig. 8. Fracción final del fraccionamiento. Obsérvense los fantasmas celulares (membrana plasmática) (1440 x).

CONCLUSIONES

Esta metodología puede adoptar fragmentos grandes de membrana plasmática de macrófago peritoneal cultivado de ratón útiles para el estudio de componentes mayores.

La membrana plasmática de esta célula mostró la composición siguiente: proteínas 35-45%, carbohidratos 6%.

RECONOCIMIENTOS

Hay que destacar el asesoramiento brindado por los compañeros A. Lage, R. Pérez y J. Gavilondo del Departamento de Química del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, así como el aporte de la

compañera R. Izquierdo en la preparación del material de cultivo celular.

REFERENCIAS

- BIANCO C. AND EDELSON P.J. Plasma membrane. Expression of Macrophage differentiation. Original article Series, Vol XIV, Number 2 pp 119-124. The National Foundation, 1978.
- CANONICO P.G., BEAUTAY H. AND NYSSSENS-JADIN M. Analytical Fractionation of Mouse Peritoneal Macrophages. Physical and Biochemical Properties of Subcellular Organells from resident (unstimulated) and cultivated cells. *Jour. of the Retic. Soc.* 24, 115, 1978.
- COHN Z. A. AND BENSON B. The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology cytochemistry and biochemistry. *J. Exp. Med.* 121, 153, 1965a.
- DANNENBERG A.M. Macrophages in inflammation and infection. *N. Engl. J. Med.* 293, 484, 1975.
- 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 indomethacin. *Agents and Actions* 5, 345, 1975.
- HENON M., BEDOUIN A. ET POLONOVSKI J. Obtention, identification et caractérisation d'une préparation de membranes plasmiques de macrophages de cobaye. *C.R. Acad. Sc. París t 285 (Serie D-121)*, 1977.
- LAGE-DÁVILA A. AND MONTAGNIER L. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 79, 577, 1977.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH W.J., FARR A.L. AND RANDALL R.J. Protein Measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
- NACHMAN R., FERRIS B. AND HIRSCH J. Macrophage plasma membrane I. Isolation and studies on protein components. *J. Exp. Med.* 133, 785, 1971.
- NOA M. Y KOURÍ J. Ultraestructura de las células mononucleares fagocíticas durante la fagocitosis inducida por látex. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 8, 39, 1977.
- OTERO A., SANABRIA J. Y DE LA ROSA M. C. Estudio de la composición celular y ultraestructura del exudado peritoneal de ratas tratadas con diferentes estimulantes. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 12, 119, 1981.
- RAVINOVITCH M. In "Mononuclear Phagocytes" R. Van Furth ed. pag. 198, Davis, Philadelphia, Pensilvania, 1970.
- RAVINOVITCH M. AND DESTEFANO M.J. Cell shape changes induced by cationic anesthetics. *J. Exp. Med.* 143, 290, 1976.

- REMOLD — O'DONNELL E. Purification of plasma membrane of Guinea pig peritoneal macrophages. Prep. *Biochem.* 7, 441, 1977.
- RODRÍGUEZ T. Tesis de Candidatura, CENIC, 1981.
- SCOTT R. E. Plasma membrane vesiculation: A new technique for isolation of plasma membrane. *Science* 195, 743, 1976.
- UNANUE E. R. The regulation of Immune Response by macrophages. In "Mononuclear phagocytes in Immunity, Infection and Pathology". R. Van Furth ed. pag. 722, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 1975.
- WARREN L., GLICK M. C. AND NOSS M. K. Membranes of animal cells I. Method of isolation of the surface membrane. *J. Cell Physiol.* 68, 269, 1966.
- WILLIAMS C. A. AND CHASE M. W. In methods in Immunology and Immunochemistry. Academic Press Inc. New York 2, 288, 1968.
- WANG P., SHIRLEY P. S., DECHATELET R. L. AND MC CALL CH. E. Purification of plasma membrane from B.C.G. induced rabbit alveolar macrophages. *Jour. Retic. Soc.* 19, 333, 1975.