

Facilitación de membrana durante la fagocitosis por incremento de la concentración extracelular de Na y Mg en macrófagos peritoneales de rata

E. NIUBÓ, B. DÍAZ, M. COMPANIONI Y J. KOURI

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

Recibido: 22 de noviembre de 1980

Recibido: 24 de marzo de 1981

ABSTRACT. Electrophysiology study was made of the effect of magnesium and sodium excess on transmembrane potential before and through phagocytic activity of peritoneal rat macrophages. Intracellularly recorder responses following 10 min exposure of cells to Na-rich Tyrode and Mg-rich Tyrode solution did not show significant changes from normal Tyrode. Addition of latex resulted in hyperpolarizations of the macrophage membrane after 30 sec. During to latex, the potential increase to— 32 mV (Na-rich Tyrode) and to —16.2 mV (Mg-rich Tyrode). The hyperpolarization response to normal Tyrode was significantly smaller than to Na-rich Tyrode but did not from Mg-rich Tyrode solution. The possible mechanism that explain these changes are discussed.

RESUMEN. Se realizó un estudio electrofisiológico sobre el efecto del exceso de sodio y magnesio en el potencial de membrana antes y durante la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales de rata. Los registros intracelulares después de exponer a las células durante 10 minutos a soluciones Tyrode ricas en sodio o magnesio no mostraron cambios significativos respecto al Tyrode normal. La adición del látex produjo a los 30 segundos hiperpolarizaciones de la membrana del macrófago, durante la respuesta hiperpolarizante al látex el potencial incremento a — 32mV (solución Tyrode rica en Na) y a —16.2 mV (Tyrode rico en Mg). La respuesta hiperpolarizante al Tyrode normal fue significativamente menor que la obtenida en solución rica en sodio, pero no así la rica en magnesio. Se discuten los posibles mecanismos que explican estos cambios.

INTRODUCCION

La contribución de los diversos iones al potencial de membrana es un fenómeno de cuantía variable dependiente entre otros factores de la naturaleza del tejido.

La génesis del potencial eléctrico parece ser la misma para las células excitables¹ a pesar de haberse señalado^{2,3} diferencias en las permeabilidades iónicas al Na y K entre ambos grupos celulares.

La importancia de los iones Mg^{++} en los fenómenos de excitación y liberación de sustancias neurohormonales ha sido señalada en tejido nervioso⁴ y en músculo⁵, no así el papel que este ión pueda desempeñar en la actividad eléctrica de células no excitables tales como las mononucleares fagocíticas.

El propósito de nuestro trabajo es estudiar en este tipo de células las influencias que las diferentes concentraciones iónicas de sodio y magnesio puedan ejercer sobre el potencial de membrana ante y durante la actividad fagocítica del macrófago.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon ratas albinas machos de 200–250 g de peso corporal, obteniéndose los macrófagos de la cavidad peritoneal según método de Ancheta y Kouri⁶ (1971). La técnica de registros intracelulares se hizo según método convencional y descrita en trabajos anteriores⁷.

Las variaciones de las concentraciones iónicas se lograron modificando las cantidades de un solo ión de la solución Tyrode normal por experiencia, con incrementos del ClNa de 124 mM/L a 248 mM/L y el Cl_2Mg de 1,2 mM/L a 3,6 mM/L.

El estudio se efectuó incubando las células durante 10 minutos en la solución Tyrode rica en Na^+ o Mg^{+2} , haciendo los registros de los potenciales de membrana a partir de este momento como valores controles y con la adición posterior de 0,1 ml de látex para inducir la fagocitosis, controlándose la actividad eléctrica de la célula en forma continua desde el momento de la adición hasta 60 minutos después.

Se usó el Test de la T para el análisis estadístico de nuestros resultados.

RESULTADOS

Estas experiencias están dirigidas a responder fundamentalmente dos cuestiones: la posible influencia de los iones Na^+ y Mg^{+2} sobre el potencial de membrana antes de inducir la fagocitosis y evaluar en

qué medidas podrían participar estos iones en las hiperpolarizaciones observadas en la fagocitosis del látex cuando los macrófagos se encuentran en solución Tyrode normal.

Cambios del PT del macrófago en Solución Tyrode con incrementos de la concentración de Na^+ antes de la fagocitosis

Del total de preparaciones usadas se incubaron 25 células en Solución Tyrode con una concentración de ClNa 248 mM/L a 37°C , registrándose sucesivamente los cambios del potencial durante los primeros 30 minutos de incubación, lo que nos permitió concluir que las variaciones a los 10 minutos no diferían significativamente de las observadas en momentos posteriores, por lo cual referimos nuestros resultados a este tiempo.

La tendencia general de las células fue un ligero incremento de su potencial de transmembrana a -14 ± 1.2 mV (Fig. 1a) el cual no difirió significativamente del observado en Tyrode Normal (13.1 ± 0.5 mV) (Tabla I).

Cambios del PT del macrófago en solución tyrode por incremento en la concentración de Na^{++} al inducirse la fagocitosis con látex

Una vez que las células alcanzaban a los 10 minutos sus valores máximos de PT en el medio rico en Na^+ se inducía la fagocitosis por la adición de 0.1 ml de látex. Nuestros resultados muestran que la totalidad de las células variaron su PT en forma oscilatoria durante los 5 minutos sucesivos a la adición de látex con la secuencia siguiente:

Hiperpolarización—despolarización—hiperpolarización. (Figs. 1b, c, y d) (Tabla I), ocurriendo a los 30 seg una hiperpolarización inmediata a -32 ± 1.7 mV (Fig. 1b) significativamente mayor ($p < 0.01$) respecto a las obtenidas en Tyrode normal. El segundo cambio o despolarización ocurrió a los 3 minutos de la adición de látex con un valor promedio de -14.7 ± 1.24 mV (Fig. 1c) evidenciándose que el PT es muy semejante al correspondiente al momento de la adición, para nuevamente incrementarse hasta -27.2 mV (Fig. 1d) a los 5 minutos con una posterior recuperación.

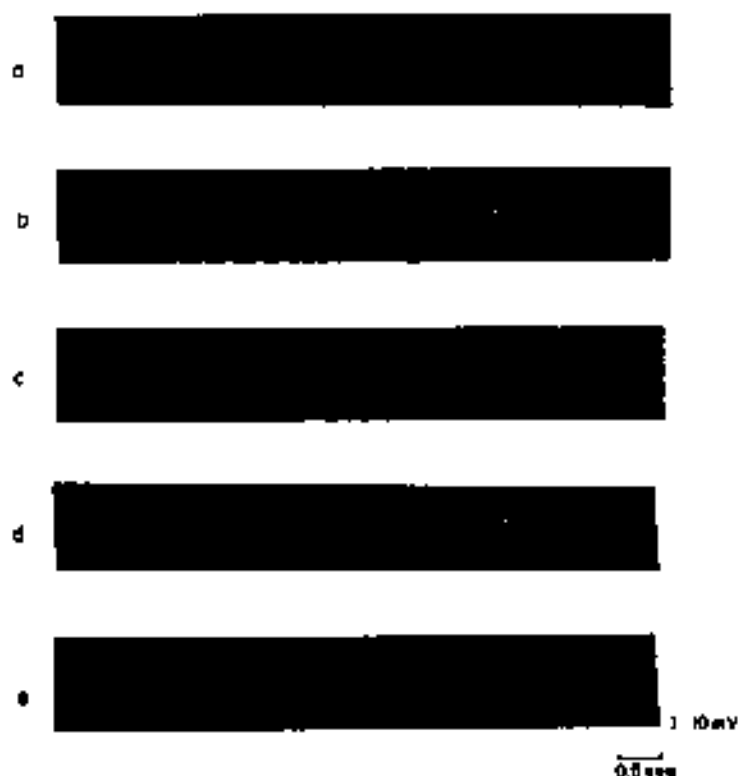


Fig. 1

Cambios del PT de macrófagos en Tyrode por incrementos de la concentración de Mg^{++} antes de la fagocitosis

En esta serie de experiencias la muestra analizada fue de 13 células; la mayor variación del PT al igual que para el Na^{+} ocurrió a los 10 minutos de incubación siendo los valores promedio del PT de -10.8 ± 1.7 mV (Fig. 2a) no difiriendo significativamente respecto a los valores obtenidos en la Solución Tyrode Normal (Tabla II).

TABLA I

PT de macrófagos antes y durante la fagocitosis de solución Tyrode con ClNa 248 mM/L

PT (mV) en solución Tyrode Normal	PT en ClNa 248 mM/L a los 10'	Hiper. inmu. (y max) a los 30 seg. Látex.	PT 3' látex	P 5' látex	Osc. Prom.
-13 ± 0.59 mV (75)	-14.17 ± 1.24 mV (25)	-32 ± 2.73 mV (5)	-14.7 mV	-27.2 mV	15 mV

TABLA II

PI de macrófagos antes y durante la fagocitosis en solución Tyrode con Cl₂Mg 3.6 mM/L

PT (mV) en solución Tyrode Normal	PT en Cl ₂ Mg 3.6 mM/L a los 10'	Hiper. inmu. (y máx) a los 30 seg. látex	PT a los 3' látex	PT a los 5' látex	PT a los 10' látex	Osc. prom.
-13 ± 0.59 mV (75)	-10.84 ± 1.72 mV (13)	-16.23 ± 3.52 (3)	-10 mV	-15.5 mV	-5 mV	7.2 mV

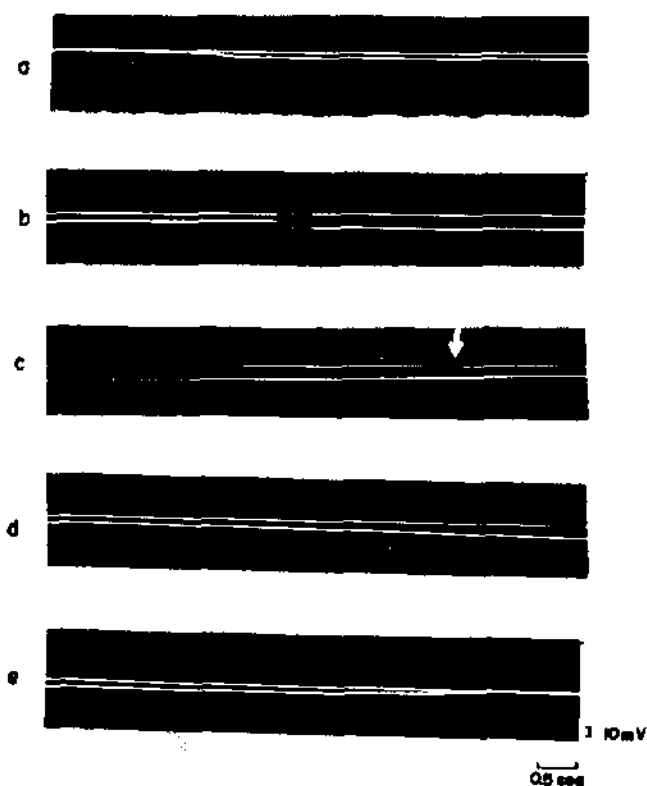


Fig. 2

Cambios del PT del macrófago en Tyrode con incrementos en la concentración de Mg^{2+} al inducirse la fagocitosis con látex

Cuando las células sometidas a mayores concentraciones de Mg^{2+} alcanzaron el nivel máximo del PT se les inducía la fagocitosis, pudiendo observarse a partir de este momento y durante los 10 minutos siguientes variaciones cíclicas del potencial muy semejantes a las registradas con los incrementos de las concentraciones extracelulares de sodio; con la secuencia siguiente: Hiperpolarización-despolarización-hiperpolarización-despolarización (Fig. 2) que permitió agruparlas en diferentes tiempos (Tabla II).

La hiperpolarización inicial ocurrió a los 30 segundos de la adición alcanzando un valor de -16.2 ± 3.5 mV (Fig. 2b) el cual no difiere significativamente de -18.9 ± 0.6 mV observado en Tyrode Normal. El segundo cambio o despolarización se observó a los 3 minutos con un valor promedio de -10 mV (Fig. 2c) siendo esta respuesta menor que la registrada con altas concentraciones de sodio. La tercera variación fue muy semejante a la primera con una magnitud de -15.5 mV a los 5 minutos (Fig. 2d) coincidiendo en tiempo a los valores encontrados para los incrementos de Na^+ . Por último, a los 10 minutos la respuesta oscilatoria estuvo dada por una nueva despolarización, mucho más pronunciada que la primera, reduciéndose en este momento el potencial de membrana a valores inferiores a los registrados antes de adicionar látex.

DISCUSION

Nuestras experiencias han sido realizadas en macrófago de 72 horas por su predominio en la población celular⁶. La actividad eléctrica que acompaña a la fagocitosis de partículas de látex en macrófagos peritoneales de rata en Tyrode, ha sido reportada por Kourí y cols.⁷ (1980).

Nuestros resultados muestran una tendencia a incrementos del PT de estas células en soluciones con alto $[\text{Na}^+]$ y hacia la despolarización en soluciones con alta $[\text{Mg}^{2+}]$; pero ambas tendencias no desvían significativamente el PT encontrado antes de la fagocitosis con concentraciones de Na^+ y Mg^{2+} normal.

Schanne y Coraboeuf⁸ (1966) argumentan que los bajos potenciales de membrana en reposo de las células inexcitables, se deben a que poseen una alta permeabilidad a los iones Na, mientras que Lam y Mac Kinnon^{2,3} (1971) concluyen en un estudio realizado en células L y que la P_{Nr} es similar a la P_{k} al ser esta última 100 veces menor que en el músculo esquelético.

Es importante enfatizar, que la diferencia de potencial eléctrico de membrana se origina principalmente de la distribución desigual de los iones Na y K^+ , a ambos lados de la membrana celular y de la contribución de la bomba de sodio¹⁰. En células L^{2,3} se ha mostrado no sólo la influencia de inhibidores metabólicos sobre el transporte activo de iones Na^+ y K^+ , sino también que su razón de acoplamiento es de 3 moléculas de sodio por cada 2 de potasio.

El pequeño incremento del PT encontrado antes de inducir la fagocitosis por látex, en las células sometidas a altas $[\text{Na}^+]_o$, pudiera ser resultado de un incremento de la entrada pasiva de sodio siguiendo a un mayor gradiente electroquímico, lo que a su vez estimularía la actividad de la bomba de sodio¹¹, aportando unos pocos mV más a los ya existentes.

Las hiperpolarizaciones obtenidas en nuestras experiencias en el transcurso del 1er. minuto de inducir la fagocitosis en un medio rico en Na^+ , fueron significativamente mayores respecto a las obtenidas en solución Tyrode normal⁷, concluyéndose en esta última, acorde con los planteamientos de Gallin y cols.¹² que dicha hiperpolarización podría estar relacionada a incrementos de la permeabilidad de la membrana para el K^+ .

Es muy probable, que el PT que precede a la inducción de la fagocitosis actúa como facilitador de la membrana a incrementos posteriores de la P_k . A semejanza de este efecto, en tejidos excitables como el nervioso¹³ y músculo cardíaco¹⁴ se ha reportado que la reducción del potencial de reposo (E_m) conduce a una disminución de la capacidad de la fibra para incrementar la permeabilidad de los portadores de carga responsables del potencial de acción.

En cuanto a las despolarizaciones observadas en soluciones con altas $[\text{Mg}^{2+}]_o$, fue una respuesta sorpresiva aun cuando esta diferencia no fuera significativa con los potenciales registrados en soluciones con Mg^{2+} normal, ya que se ha reportado en tejidos excitables^{5,14}, una ausencia de respuesta del E_m en reposo y sí una afectación en la transmisión neuromuscular y en acoplamiento excitación-contracción⁴ por un mecanismo competitivo con el Ca^{2+} , así como al umbral eléctrico de las membranas excitables⁵.

O'Donnell y Kovács¹⁵ (1974) reportaron que el músculo esquelético expuesto a altas $[\text{Mg}^{2+}]_o$ puede incrementar su $[\text{Mg}^{2+}]_i$; en forma libre por una penetración lenta a través de la membrana celular, provocando cambios de las permeabilidades iónicas al Na^+ y al K^+ sin alterar los valores del E_m en reposo. Posiblemente, en nuestras experiencias con macrófagos la penetración de los iones Mg se haya visto seguida de cambios semejantes de la permeabilidad para el Na^+ y el K^+ , aunque en cuantía diferente, decrementando el PT.

Los cambios hiperpolarizantes observados en este medio, una vez inducida la fagocitosis, pudiera ser el reflejo de una afectación mayor

de la permeabilidad de la membrana para los iones K. El decremento del potencial previo a la inducción de la fagocitosis, pudiera disminuir la permeabilidad de la membrana para los iones K, mostrando estas células hiperpolarizaciones por látex menores que las registradas en Tyrode normal.

Las oscilaciones del potencial de membrana observadas en altas concentraciones de Na^+ y de Mg^{2+} durante la fagocitosis, pudieran estar relacionadas a fluctuaciones transitorias de la permeabilidad iónica de la zona de membrana adyacente a la punta del microelectrodo, influida por múltiples factores, como la formación de una vacuola fagocítica o el englobamiento de una porción de membrana, que podrían en un momento dado, preveer la penetración de un ión determinado.

De los resultados obtenidos en este estudio, puede concluirse que, los iones Na y Mg participan en alguna medida en el PT del macrófago cuando no se ha inducido la fagocitosis, pero sus influencias se hacen más evidentes en los eventos relacionados con la actividad fagocítica provocando magnitudes diferentes de hiperpolarización del PT durante la fagocitosis a través del establecimiento de un potencial facilitador o inhibidor de la membrana.

REFERENCIAS

1. KORCHAK H. M. AND WEISSMANN G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3818, 1978.
2. LAMB J. F. AND MACKINNON M. G. A. *J. Physiol.*, 213, 683, 1971a.
3. LAMB J. F. AND MACKINNON M. G. A. *J. Physiol.*, 213, 665, 1971b.
4. WOJTOWICS J. M., MARSHALL K. C. AND HENDELMAN W. J. *Can. J. of Physiol. and Pharmacol.*, 55, 367, 1977.
5. DEL CASTILLO J. AND ENGBACK L. J. *Physiol. London*, 124, 370, 1954.
6. ANCHETA O. Y KOURÍ J. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 3, 111, 1971.
7. KOURÍ J., DÍAZ B., NOA M. AND NIUBÓ E. *Nature* 283, 868, 1980.
8. SCHANNE O. AND CORABOEUF E. *Nature, London*, 210, 1390, 1966.
9. WALTER WOODBURY J. The cell membrane: Ionic and potential gradients and active transport. *Physiology and Biophysics*. Ed. by T. C. Ruch and H. D. Patton. W. B. Saunders Company. Phyladelphia and London, 1, 25, 1965.
10. THOMAS R. C. *Physiol. Rev.*, 52, 563, 1972.
11. FRUMENTO A. S. *Science*, 147, 1442, 1965.

12. GALLIN E.K. AND GALLIN J.I. *J. of Cell. Biol.*, 75, 277, 1977.
13. HODKING A.L. AND HUXLEY A.F. *J. Physiol.*, 116, 497, 1952.
14. WEIDMANN S. *J. Physiol.* 127, 213, 1955.
15. O'DONNELL J.M. AND KOVÁCS Y. *Pflugers Arch.*, 350, 321, 1974.