

Efectos de la citocalasina B sobre los macrófagos. Cambios electrofisiológicos antes y durante la fagocitosis

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

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

Recibido: 5 de marzo de 1981

Recibido: 11 de marzo de 1981

ABSTRACT. Membrane peritoneal rat macrophages electrical activity was studied using an inhibitor (Cytochalasin B) of the engulfment phase of the phagocytosis before and after inducing phagocytosis by latex particles. Transmembrane cell potential in Cytochalasin B (2×10^{-5} M) treated cells remained invariable during 40 min of incubation. Slow hyperpolarization during the first minute of latex addition, was observed. The maximum potential value was reached among the second and the third minutes showing a transmembrane potential recuperated its original value and kept on increasing it during 21 min. The original values were again obtained after 30 min of the induced phagocytosis. Ionic movements involved in these changes are discussed.

RESUMEN. Se realiza un estudio de la actividad eléctrica de la membrana del macrófago peritoneal de rata, sometido a la acción de la Citocalasina B inhibidor de la fase de englobamiento, antes y después de inducida la fagocitosis con partículas de látex. La Citocalasina B (2×10^{-5} M) no induce variaciones del potencial de membrana de los macrófagos durante 40 minutos de incubación. Durante la fagocitosis se observó una despolarización lenta dentro del primer minuto de la adición de las partículas de látex que alcanzó su máximo entre el segundo y tercer minutos con potencial promedio de 2,5 mV para luego incrementarse en 6,9 mV como valor promedio a los 21 minutos, regresando a sus valores iniciales a los 30 minutos. Se discuten los posibles mecanismos iónicos involucrados en estos cambios del potencial.

INTRODUCCION

La información existente acerca de la actividad eléctrica de las células que intervienen en los mecanismos de defensa del organismo, es escasa en la literatura. Entre las células mejor caracterizadas electrofisiológicamente se encuentran los macrófagos de diversas especies ante

estímulos no fagocíticos (*Galín y Gallin, 1977; Gallin y cols., 1975; Dos Reis y cols., 1979*).

Nuestro grupo de trabajo ha reportado (*Kourí y cols., 1980*) los patrones de respuesta eléctrica de los macrófagos peritoneales de ratas durante la fagocitosis de partículas de látex, dados por tres eventos bien diferenciados, siendo el más constante y notorio las hiperpolarizaciones inmediatas y mantenidas del potencial de transmembrana (PT), pero no se estableció qué fenómenos de membrana, involucrados en la fagocitosis, acompañan a estos cambios eléctricos.

Teniendo en cuenta que el látex se une a la membrana del macrófago por medio de los receptores inespecíficos (*Zeigler y Schugar, 1979*) elegimos la Citocalasina B (CB) como bloqueador de la fase de englobamiento para así discernir si las hiperpolarizaciones inmediatas, acompañadas de pulsos y oscilaciones de membrana reportados, se corresponden con la unión de la partícula al receptor o al contrario están asociadas a la ingestión, ya sea como mecanismo permisivo y por lo tanto previo, o simplemente traduzca el acto del englobamiento.

MATERIALES Y METODOS

Las experiencias se realizaron en macrófagos extraídos de la cavidad peritoneal de ratas machos albinas de 200-250 g a las 72 horas de haberles implantado un anillo de teflón con ionoagar al 2%.

Como agente bloqueador de la fagocitosis se empleó la Citocalasina B (Sigma) 2×10^{-5} M (10 ug ml^{-1}) disueltos en solución Tyrode-DMSO al 0,2%.

Los registros electrofisiológicos se efectuaron con microelectrodos de vidrio llenados con KCl 3M, con una resistencia de punta de 10-30 MΩm.

Las variaciones eléctricas del PT se monitorearon a través de la pantalla de un osciloscopio, fotografiándose de un modo continuo.

Se realizaron dos series experimentales:

- I. Células incubadas en solución Tyrode-DMSO al 0,2% y
- II. Células incubadas en CB.

La primera serie experimental se hizo con el fin de demostrar la no afectación de la fagocitosis del látex por la presencia del DMSO en la

solución del baño, para lo cual se emplearon concentraciones al 0,2; 0,5; 0,8 y 1% de DMSO. En líneas generales se siguió el mismo procedimiento que en la serie II.

Serie II. Una vez extraído de la cavidad peritoneal el anillo con las células se incubaron en la solución de CB a 37°C.

Al inicio de cada experiencia se hacía un muestreo exploratorio del PT de las células para obtener un criterio de la posible afectación del mismo por efecto de la CB. Posteriormente se inducía la fagocitosis por la adición de 0,1 ml de látex, haciéndose registros continuos hasta 30 minutos después.

El análisis estadístico de los datos se realizó por medio de la U' de Mann Whitney.

RESULTADOS

Las células incubadas de 1-60 minutos a 37°C en DMSO al 0,2; 0,5; 0,8 y 1% no mostraron cambios significativos del PT ni antes ni después de inducida la fagocitosis, al compararlos con los valores obtenidos antes y después de inducir la fagocitosis con látex y solución Tyrode normal.

Cambios del PT de macrófagos incubados en CB.

Un grupo de células incubadas en CB, haciéndose registros del potencial desde el momento en que comenzó la incubación, observándose que el PT no varió durante 40 minutos (Fig. 1a.).

Los valores promedios de las diferencias de potencial observadas al adicionar las partículas de látex dentro de los primeros 20 minutos de incubación fueron:

1. Una despolarización lenta que comenzaba dentro del primer minuto de la adición y que alcanzó su máximo entre el segundo y tercer minuto, con un decremento promedio de 2,5 mV. (Fig. 1 b-c).
2. Siguiendo a la despolarización inicial el potencial comenzaba lentamente a incrementarse para alcanzar el valor que tenía antes de la adición entre el noveno y décimo minuto de inducida la fagocitosis, incrementándose en 6,9 mV a los 21 minutos (Fig. 1d).

3. A los 30 minutos de inducida la fagocitosis, las células habían recuperado nuevamente su potencial inicial. (Fig. 1c).

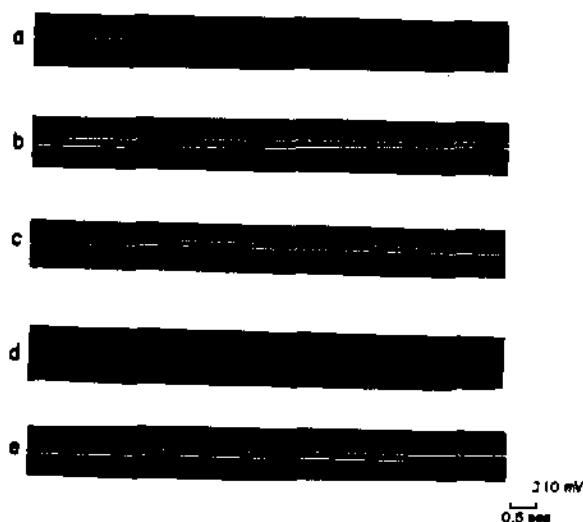


Fig. 1. Potenciales de transmembrana en macrófagos incubados en CB antes y después de la adición de partículas de látex. a. Entrada a una célula incubada 20 minutos en CB. b. PT dentro del primer minuto de la adición del látex. c. Disminución del PT a los 3 minutos de la adición del látex. d. Incremento del PT a los 21 minutos de la adición del látex. e. PT a los 30 minutos de la adición.

La Tabla I muestra un resumen de los resultados obtenidos al adicionar látex a las células incubadas en CB.

TABLA I

PT de los macrófagos incubados en Citocalasina B antes y durante la fagocitosis

PT en Tyrode Normal	Variación PT al mi- nuto látex	PT a los 3' látex	PT a los 10'	PT a los 21'	Recuper. PT a los 33'
-43 ± 0.59 mV	Dism. 1 mV	Dism. 2.75 mV	Aum. 2.75	Aum. 7 mV	5.1

DISCUSION

Partiendo de que la fagocitosis de partículas de látex por los macrófagos peritoneales de rata muestran hiperpolarizaciones inmediatas y mantenidas del PT, nos propusimos estudiar los eventos eléctricos que acompañan a la adición de látex a estas células cuando se ha inhibido la fase de englobamiento pero no la de adhesión, usando la CB como bloqueador de los receptores inespecíficos.

En nuestras experiencias las células tratadas con CB por períodos de 40 minutos, no mostraron alteraciones significativas en su potencial de transmembrana, sin embargo, la adición de látex estuvo acompañada de fenómenos despolarizantes de pequeña magnitud dentro del primer minuto, que alcanzan su valor máximo en un tiempo de 2 a 3 minutos, para después incrementar muy lentamente su potencial hasta valores ligeramente superiores a los controles a los 21 minutos, recuperando su PT a los 30 minutos de la adición.

La CB afecta primordialmente la maquinaria contráctil de la célula, inhibiendo reversiblemente la fagocitosis y otros tipos de movimientos celulares, con efectos metabólicos (Zigmond e Hirsch, 1972) ultraestructurales (Zeigler y Schugar, 1979; Axline y Reaven, 1974; Reaven y Axline, 1973) y funcionales (Zeigler y Schugar, 1979) incluyéndose entre estos la inhibición de la liberación de calcio intracitoplasmático (Axline y Reaven, 1974).

El hecho de que se observen despolarizaciones del PT con la adición del látex y no durante la incubación de las células en CB en ausencia de partículas, apoya el planteamiento de que la CB por sí misma no es capaz de alterar la respuesta eléctrica de las células, pero no nos permite negar la coexistencia de alteraciones en la permeabilidad iónica de la membrana para uno o más iones que pudiesen estar involucrados en la segunda fase de la fagocitosis en los mecanismos de interacción partícula-receptor.

Es evidente que los cambios conformacionales de la membrana en la fase inicial de adhesión podrían activar incrementos de su permeabilidad, especialmente a los iones sodio y calcio, traducándose en una respuesta despolarizante, la cual en nuestros resultados previos (Kourí y cols., 1980) pudieran estar encubiertos por las hiperpolarizaciones atribuidas a un incremento brusco de la P_k (Gallin y cols., 1975; Kourí y

cols., 1980) asociado al englobamiento de la partícula. De ser así, la prolongación de la respuesta despolarizante en el tiempo, quedará justificada si pensamos que la partícula puede mantenerse unida al receptor de membrana sin que ocurran nuevos cambios. Gallin (*Gallin y Gallin*, 1977) ha reportado en macrófagos humanos que la respuesta eléctrica ante el factor quimiotáctico $C5_a$ está dada en el 24% de las células por una despolarización inicial, atribuyéndosele a un incremento de la permeabilidad catiónica, (Na^+ o Ca^{++}) más probablemente a la del calcio, no modificándose dicha respuesta por la presencia de la CB.

Las pequeñas hiperpolarizaciones de aparición tardía y poca duración en nuestras experiencias, muestran que a pesar de las altas dosis usadas de CB, la fagocitosis no se bloquea en un 100%, aunque el tiempo durante el cual transcurre es menor de 30 minutos. Este hallazgo está acorde con lo publicado por Chang, (1978) de que los macrófagos peritoneales de hamster tratados con la misma dosis de CB que la utilizada por nosotros, contenían un número exiguo de partículas de látex en su interior, sin incrementos apreciables después de los 30 minutos.

Estas pequeñas hiperpolarizaciones en presencia de CB, nos apoyan fuertemente el planteamiento de que el efecto inhibitorio de la droga está estrecha y causalmente relacionado con el decremento de la P_k del mismo modo que se afecta la liberación del calcio (*Axline y Reaven*, 1974) y a su vez evidencia la vinculación del transporte de los iones potasio a través de la membrana con el englobamiento de las partículas.

De estos resultados concluimos que las hiperpolarizaciones observadas en los macrófagos de rata después de inducirse la fagocitosis en un medio normal, están muy posiblemente relacionados con la fase de englobamiento y no con la de adhesión, así como las oscilaciones y pulsos, a pesar de su ausencia en estas experiencias, probablemente por la escasez de partículas fagocitadas. Si estas hiperpolarizaciones son fenómenos de membrana previos y necesarios para que se ingiera la partícula, o son la traducción eléctrica del englobamiento propiamente dicho, no podemos dilucidarlo aquí, aunque nos inclinemos a pensar al igual que otros investigadores en la primera alternativa. Por otra parte, la fase de adhesión más bien parece estar relacionada con despolarizaciones de membrana provocados por un incremento catiónico que a su vez opera como gatillo disparador a los cambios de permeabilidad al ion potasio, desarrollándose los subsiguientes cambios del potencial que capacitan a la membrana a la ejecución de un movimiento mecánico, aunque normal-

mente estas despolarizaciones no sean apreciables por su pequeña magnitud y por la rapidez con que se desencadenan los cambios hiperpolarizantes.

REFERENCIAS

- AXLINE S.G. AND REAVEN E.C. Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of cultivated macrophages by CB. Role of subplasmalemmal microfilaments. *J. of Cell. Biol.* 62, 647, 1974.
- CHIANG K.P. Hamster peritoneal macrophages in vivo: substratum adhesion, spreading, phagocytosis and phagolysosome formation. *In vitro* 14, 663, 1978.
- DOS REIS G. A., PERSECHINI P. M., RIBEIRO J. M. C. AND OLIVEIRA-CASTRO G. M. Electrophysiology of phagocytic membranes II. Membrane potential and induction of slow hyperpolarizations in activated macrophages. *Biochem. et Biophys. Acta* 552, 331, 1979.
- GALLIN E. K. AND GALLIN J. I. Interaction of chemotactic factors with human macrophages. Induction of transmembrane potential changes. *J. of Cell. Biol.* 75, 277, 1977.
- GALLIN E. K., WIEDERHOLD M. L., LIPSKY P. E. AND ROSENTHAL A. S. Spontaneous and induced membrane hyperpolarization in macrophages. *J. of Cell. Physiol.* 86, 653, 1975.
- KOURI J., NOA M., DÍAZ B. AND NIUBO E. Hyperpolarization of rat peritoneal macrophages phagocytosing latex particles. *Nature* 283, 868, 1980.
- REAVEN E. C. AND AXLINE S. G. Subplasmalemmal microfilaments and microtubules in resting and phagocytosing cultivated macrophages. *J. Cell. Biol.* 59, 12, 1973.
- ZEIGLER Z. AND SCHUGAR S. The effect of Cytochalasin B and alkaloid compounds on human monocyte functions. *J. of Reticuloendothelial Soc.* 25, 235, 1979.
- ZIGMOND S. H. AND HIRSCH J. G. Effects of Cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exptl. Cell. Res.* 73, 383, 1972.