

Localización y contenido de calcio en macrófagos peritoneales de rata. (Reporte preliminar)

M. FRIMAN Y J. B. KOURÍ

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

Recibido: 13 de diciembre de 1979

ABSTRACT. A qualitative study aiming to the calcium localization and contents in mononuclear phagocyte cells obtained by means of an aseptic inflammation into the peritoneal cavity of Wistar rats has been done. Several fixation liquids commonly used in electron microscopy have been assayed. They were related to the appearance of electron dense zones previously reported as linkage sites from calcium to the cell membrane. In macrophages these zones have been observed on the cellular envelope and in less quantity in the plasma membrane only when a concentration of 5 mM/l of CaCl_2 is added to the fixation liquids.

RESUMEN. Se realizó un estudio cualitativo de la localización y contenido de calcio en las células mononucleares fagocíticas de la inflamación aséptica provocada en ratas Wistar, mediante técnicas especiales de fijación. Se utilizaron varios líquidos de fijación usados comúnmente en microscopía electrónica, relacionándolos con la observación de zonas electrón densas reportadas como sitios de enlaces de calcio con las membranas celulares. En los macrófagos se observan estas zonas electrón densas en la superficie celular y en menor cantidad en la membrana plasmática cuando se añade 5 mM/l de CaCl_2 a los líquidos fijadores.

INTRODUCCION

El calcio es un ion de gran importancia en los sistemas biológicos, por ejemplo, en los mecanismos de contracción relajación muscular (*Le Roy, 1965*), en la transmisión sináptica (*Hillman y Llinas, 1974*) y en la regulación de la permeabilidad de membrana (*Oschman y Wall, 1972*).

Numerosos autores han reportado la presencia de zonas o partículas electrón densas en distintos tejidos (*Le Roy, 1965; Hillman y Llinas, 1974; Oschman y Wall, 1972; Jonas y Zeech, 1974; Oschman y cols. 1974; Tsu-*

chiya, 1976; Tsuchiya y Takahashi, 1976; Plattner, 1975; Plattner y Fusch, 1975, Boquist, 1977; Politoff, 1974) y se ha planteado que pueden representar sitios de enlaces de calcio con las membranas celulares.

En los macrófagos el ion calcio parece desempeñar un papel importante en sus funciones por lo que el objetivo de este trabajo es el estudio de la presencia y distribución del calcio en estas células, utilizando técnicas citoquímicas en microscopia electrónica con el fin de encontrar estas zonas o partículas electróndensas asociadas a las membranas celulares y poder estudiar la función que el calcio desempeña en la fagocitosis.

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratas Wistar de ambos sexos con peso promedio entre 200 y 250 g, mediante implantación de láminas de Epón 812 en la misma, manteniéndolos durante 72 horas, al término de las cuales se procedió a anestesiar las ratas con éter y extraerles las láminas (*Kouri, 1969*).

Las células obtenidas fueron fijadas en glutaraldehído al 2,7% en tampón S-Collidina 0.08 M con 5% de sucrosa y pH 7,2 (*Oschman y Wall, 1972*).

Se mostraron 4 experiencias por triplicado:

1. Células fijadas en glutaraldehído (G).
2. Células fijadas en glutaraldehído al que se añadió 5 mM/l de CaCl₂ (G + Ca⁺⁺).
3. Células fijadas en glutaraldehído y postfijadas en tetróxido de osmio al 2% en el mismo tampón (G + O_s).
4. Células fijadas en glutaraldehído y postfijadas en tetróxido de osmio añadiéndosele a ambos 5 mM/l de CaCl₂ (G + O_s + Ca⁺⁺).

La fijación en glutaraldehído se realizó toda la noche a 4°C; se deshidrató en alcoholos de gradaciones crecientes. Se infiltró e incluyó en Epón 812 en las experiencias 1 y 2.

Las experiencias 3 y 4 se fijaron en glutaraldehído toda la noche a 4°C y postfijaron en tetróxido de osmio durante una hora a 4°C. La deshidratación, infiltración e inclusión se efectuaron de la misma manera que las experiencias anteriores.

La polymerización se realizó a 60°C durante 48 horas, realizándose los cortes en un ultramicrótomo LKB, Ultrotome III y el montaje sobre rejillas de 400 mesh sin membrana soporte.

Las observaciones fueron hechas en los microscopios electrónicos de transmisión Hitachi HS- 7 y HU- 11A, sin postcontraste.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran la presencia de regiones electróndensas en la superficie celular y en la membrana plasmática de macrófagos peritoneales de ratas adultas utilizando técnicas citoquímicas especiales en microscopia electrónica, cuando el ion calcio está presente en la fijación (Fig. 1).



plasma de axones de calamar (*Alema y cols.*, 1973), localizada también en la membrana plasmática de células intestinales (*Oschman y Wall*, 1972) que parece intervenir en el transporte de calcio a través de la membrana.



Fig. 2. Fijación en glutaraldehído + CaCl_2 . Se aprecian adheridas a la superficie celular partículas electróndensas. 16,000 X.

En las células fijadas en glutaraldehído en ausencia de calcio (G) generalmente no se observan estas partículas electróndensas (Fig. 3).

Lo anteriormente expuesto hace suponer que estas regiones electróndensas pudieran ser sitios de enlace de calcio.

Las células fijadas en glutaraldehído y postfijadas en tetróxido de osmio en presencia de calcio (5 mM/l de CaCl_2) ($G + \text{O}_s + \text{Ca}^{++}$) presentan una reacción similar a la observada cuando se usa la fijación con glutaral-

dehido y calcio, sin postfijar; pero las partículas electróndensas son menos frecuentes, pues se ha planteado que el osmio puede ejercer una acción descalcificante (*Oschman y Wall, 1972*).

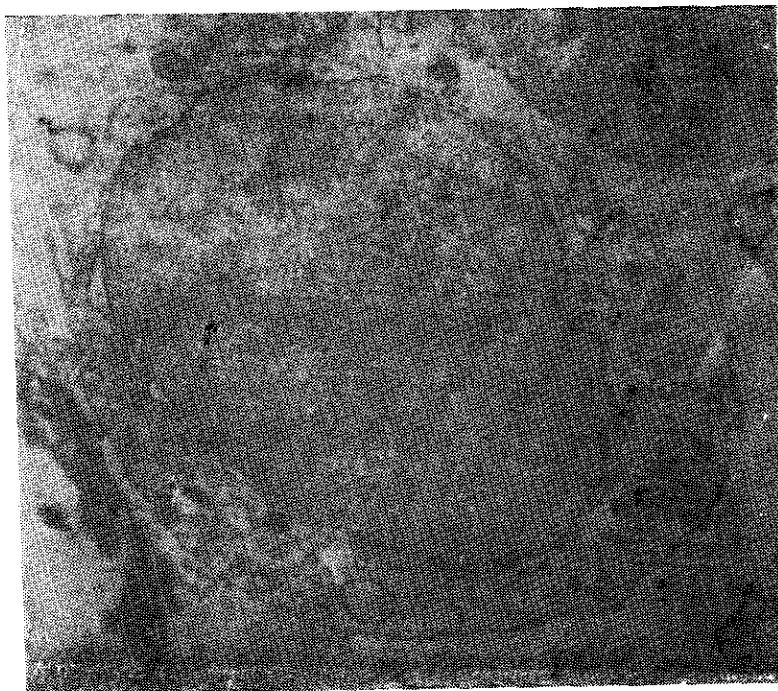


Fig. 3. Fijación en glutaraldehído. No se aprecian partículas electróndensas.
15,000 X.

En los macrófagos sometidos a doble fijación en ausencia de calcio ($G + O_s$) no se observan estas partículas.

Nuestros resultados muestran que si el medio extracelular está libre de calcio la concentración intracelular de este ion no es la suficiente como para que estas partículas sean visualizadas por el método usado.

Este trabajo sienta las bases para un estudio posterior de la función que desempeña el calcio en un mecanismo tan fundamental de defensa como es la fagocitosis.

REFERENCIAS

- ALEMA P., CALLISSANO G., RUSCA AND GIUDITTA A. Identification of a calcium binding, brain specific protein in the axoplasm of squid giant axons. *J. of Neurochem.* 20, 681 1973.
- BOQUIST L. Electron dense plaques (calcium sites) in the plasma membrane of the Endocrine cells in Rodent pancreatic Islets and parathyroid glands. *Cell and Tissues Research* 117, 81, 1977.
- HILLMAN D. E. AND LLINAS R. Calcium containing electron dense structures in the axons of the squid giant synapse. *J. Cell Biol.* 61, 146, 1974.
- JONAS L. AND ZEECH U. The subcellular calcium distribution in the smooth muscle cells of the pig coronary artery. *Experimental Cell Research* 89, 352-358, 1974.
- KOURÍ J., STOYANOV J., Y ANCHETA O. Método para el estudio en microscopía electrónica de macrófagos peritoneales en capa unicelular. Presentado II Seminario Científico CENIC, 1969.
- LE ROY L. Localization of calcium accumulating structures in striated muscle fibers. *Science* 147, 158, 1965.
- OSCHMAN J. L., AND WALL B. Calcium binding to intestinal membrane. *J. of Cell Biol.* 55, 58, 1972.
- OSCHMAN J. L., HALL T. A., PETERS P. D., WALL B. J. Association of calcium with membranes of squid giant axon. Ultrastructure and microprobe analysis. *J. Cell Biol.* 61, 156, 1974.
- PLATTNER H. Ciliary granule plaques: Membrane intercalated particles aggregates association with Ca^{++} binding sites in Paramecium. *J. Cell. Sci.* 18, 257, 1975.
- PLATTNER H. AND FUSCH S. X ray microanalysis of calcium binding sites in Paramecium with special reference to exocytosis. *Histochemistry* 45, 23, 1975.
- POLITOFF A. L. The calcium binding sites of synaptic vesicles of the frog sartorius neuromuscular function. *J. Cell. Biol.* 61, 818, 1974.
- TSUCHIGA T. Electron microscopy and electron probe analysis of the Ca-binding sites in the cilia of Paramecium caudatum. *Separatum Experientia* 32, 1176, 1976.
- TSUCHIGA T. AND TAKAHASHI K. Localization of possible calcium binding sites in the cilia of Paramecium caudatum. *J. Protozool.* 23, 523, 1976.