

## **Influencia del pH<sup>e</sup> sobre la actividad eléctrica del macrófago peritoneal de rata**

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

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

*Recibido: 22 de noviembre de 1980*

**ABSTRACT.** The electrical activity of peritoneal rat macrophages was measured before and after inducing phagocytosis using pH 7.1 and 6.8 and the results were compared with the ones obtained when pH 7.4. Conventional electrophysiological recorders with glass microelectrodes were used and depolarizations and inversion to electropositive values of the membrane potential to pH 6.8 were described during phagocytosis. Physiological signification of these findings are discussed.

**RESUMEN.** Se midió la actividad eléctrica de macrófagos peritoneales de rata antes y durante la fagocitosis a pH 7,1 y 6,8, comparando los resultados con los obtenidos a pH 7,4. Para ello se empleó la técnica convencional de registros intracelulares con microelectrodos de vidrio. Se describen despolarizaciones e inversión a valores electropositivos del potencial de membrana a pH 6,8 durante la fagocitosis. Se discute la significación fisiológica de estos hallazgos.

### **INTRODUCCION**

Las moléculas proteicas constitutivas de las membranas celulares se comportan como grupos ácidos a pH normal, cargándose negativamente, repeliendo a los aniones. Por el contrario, incrementos en la acidez del medio extracelular conllevan inversiones de cargas de negativas a positivas e incrementos en la permeabilidad aniónica de la membrana (*Burès y cols.*, 1967).

Es bien conocido que cambios en el pH afectan la transmisión neuromuscular atribuyéndose por Scuka, (1977) a una disminución en la constante de afinidad del complejo Acetil-Colina-Receptor, en las placas terminales de la unión neuromuscular, al disminuir el pH a 5.4.

Receptores de tipo no específicos a las partículas de látex han sido descritos por Silverstein y cols., (1977) para las membranas celulares del macrófago, así como cambios en la actividad eléctrica celular durante la inducción de la fagocitosis con látex por Kourí y cols., (1980).

El objetivo del presente trabajo es el determinar las influencias que las disminuciones del pH extracelular pueden ejercer sobre la actividad eléctrica del macrófago antes y durante la fagocitosis.

## MATERIALES Y METODOS

Para la obtención de las células mononucleares fagocíticas (macrófagos) se usaron ratas machos albinas de 200-250 g de peso corporal a las cuales se les implanta un disco de teflón estéril con ionoagar al 2% en solución Tyrode en la cavidad peritoneal (*Ancheta y Kourí, 1974*). A las 72 horas el disco es retirado y colocado en una cámara de perfusión con solución Tyrode de la siguiente composición: ClNa 124 mM; Glucosa 5.5 mM;  $\text{CO}_3\text{HNa}$  15 mM; ClK 2.7 mM;  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1.2 mM;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  2.5 mM;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  1.2 mM a 37°C y burbujeada con  $\text{O}_2$  al 95% y  $\text{CO}_2$  al 5%.

Para los registros intracelulares se usaron microelectrodos de vidrio, llenados con ClK 3M y resistencia entre 3 y 50 M con potenciales de punta menores de 5mV acoplados mediante un circuito tipo "Seguidor Catódico" a la entrada de un preamplificador diferencial MZ-4 visualizándose los registros en la pantalla de un osciloscopio VC-8 y fotografiados con una cámara quimográfica PC-2A, a velocidades de 5, 10, 20 y 50 mm/seg todos de la Nihon Kohden.

Los diferentes cambios del pH del medio extracelular  $\text{pH}_e$  se realizaron añadiendo ClH 0.1 N al medio celular, ajustándolo a valores de 7 y 6.8. La fagocitosis se indujo añadiendo latex de la Difco de 0.8 u de diámetro en una proporción 1:10 vol/vol a la preparación.

El Test de la T se utilizó en la determinación de los niveles de significación entre los grupos celulares estudiados.

Se midieron los siguientes parámetros:

- Potenciales de Transmembrana antes de la fagocitosis = PT-controles
- Potenciales de Transmembrana durante la fagocitosis = PT-latex.
- Potenciales de Transmembrana antes y durante la fagocitosis a pH de 7.1 y 6.8 = PT-CH y PT-(Latex + ClH) respectivamente.

## RESULTADOS

Los ajustes de pH al medio extracelular de 7.4 a 7.1 no modificaron la actividad eléctrica celular del macrófago antes ni durante la fagocitosis inducida por el latex comportándose los resultados en igual forma a lo reportado en trabajos anteriores (*Kouri y cols., 1980*). Cuando los cambios se hicieron a  $\text{pH}_e$  6.8, los valores del potencial de Transmembrana antes de la fagocitosis no variaron con respecto a los encontrados en 7.4 y 7.1. Sin embargo, cuando el ajuste se hizo una vez inducida la fagocitosis, ocurrieron despolarizaciones inmediatas sobre los efectos hiperpolarizantes ocasionados por la inducción de la fagocitosis (Fig. 1).

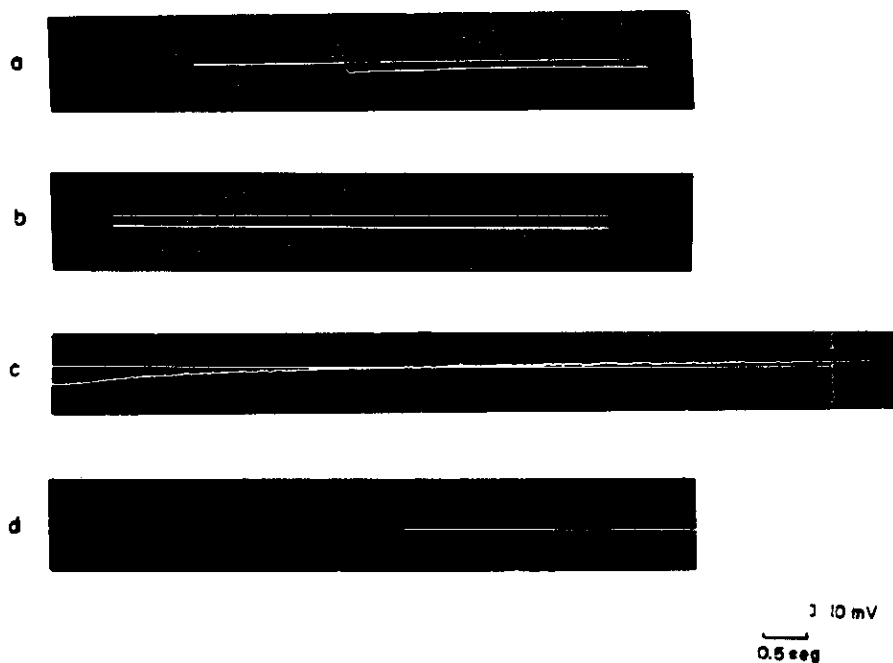


Fig. 1. Potenciales de transmembrana de macrófagos peritoneales de ratas al cambio de pH de 7.4 a 6.8: (a) PT en solución Tyrode  $\text{pH}_e$  7.4 (b) incremento del PT con la adición de latex a  $\text{pH}_e$  7.4; (c) despolarización e inversión a valores electropositivos del PT a  $\text{pH}_e$  6.8. Obsérvese las oscilaciones y pulsos de membranas (d) retirada del microelectrodo de la célula.

Las cifras promedio de las despolarizaciones fueron de  $-9.8 \pm 2.67$  mV en los primeros 500 mseg del cambio del pH hasta alcanzar inversiones del PT a cifras electropositivas de  $+3.1 \pm 0.36$  mV al minuto (Tabla I) las cuales se mantuvieron invariables mientras no se modificó el pH de la solución.

TABLA I

*Potenciales de Transmembrana de macrófagos antes y durante la adición de latex y cambios de pH.*

	PT (mV)	pH
Control	$-13 \pm 0.59$ (75)	7.4
Latex (30 segundos)	$-18 \pm 0.7$ (70)	7.4
Latex + CIH (500 mseg)	$-9.8 \pm 2.6$ (15)	6.8
Latex + CIH (1 minuto)	$+3.1 \pm 0.3$ (15)	6.8

Valores promedio de los PT; Error Standard y entre paréntesis el número de ratas usadas.

Las oscilaciones y pulsos de membrana (Kouri y cols., 1980) no se modificaron con las despolarizaciones ni inversión del PT (Fig 1c). La amplitud y duración de las descargas o pulsos fueron de  $2.3 \pm 0.3$  mV y de  $0.35 \pm 0.34$  segundos respectivamente y para las oscilaciones de  $3 \pm 0.25$  mV y  $2.5 \pm 0.14$  segundos (Tabla II), las cuales no fueron significativas a las encontradas a pH 7.4.

TABLA II

*Amplitud y duración de las descargas (pulsos) y oscilaciones de membrana del macrófago a pH 6.8 durante la fagocitosis inducida por latex*

	Amplitud (mV)	Duración (seg)
Descargas (pulsos)	$2.3 \pm 0.3$ (12)	$0.35 \pm 0.3$
Oscilaciones	$3 \pm 0.25$ (12)	$2.5 \pm 0.1$

Valores promedio de las amplitudes y duración de pulsos y oscilaciones. Error Standard y entre paréntesis el número de ratas usadas.

Las duraciones de las amplitudes y oscilaciones son tiempos promedio total en que la célula puede descargar y oscila en forma repetitiva como fenómeno impuesto a la despolarización e inversión electropositiva del PT.

## DISCUSION

Nuestros resultados demuestran que las variaciones realizadas en el pH extracelular a 6.8 se acompañan de pronunciados cambios en la actividad eléctrica del macrófago durante la fagocitosis, no así antes de inducir ésta.

El no haber encontrado modificaciones del PT a pH 7.1 y 6.8 antes de inducir la fagocitosis nos acercan a las observaciones de Hulser, (1971) en células He La y Vleugels y Carmeliet, (1975) en células de tejidos excitables quienes refieren sólo ligeras modificaciones del Potencial de Reposo en los estados de acidez celular.

Sin embargo, creemos que las despolarizaciones e inversiones electropositivas del PT no son de fácil explicación, en especial por la escasez de investigaciones existentes en el campo de la actividad eléctrica del macrófago y su relación con la fagocitosis.

Es conocido que la distribución de iones H a través de la membrana celular no se realiza en forma pasiva regulándose el control del pH intracelular mediante dos importantes mecanismos: transporte activo de los iones H y sistema tampón intracelular. Una inhibición del transporte activo puede provocarse por incrementos de las concentraciones de dicho ion en el medio intracelular, como los observados con la adición de CLH en el espacio extracelular, (Woodbury, 1960).

Se ha planteado a la Bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente como la responsable del transporte de los iones, Schwartz y cols., (1975) reportaron una menor actividad del sistema enzimático ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  al disminuir el pH del medio celular. La presencia de este sistema ha sido demostrada en células del tipo de las estudiadas por nosotros, por Glynn, (1962), y Whittam, (1962), en glóbulos rojos y Naccache, (1977) en leucocitos.

Las despolarizaciones encontradas en los cambios bruscos de pH de 7.4 a 6.8 bien pudieron estar relacionadas con un efecto inhibidor de la Bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  o bien con alteraciones en la permeabilidad iónica de

la membrana celular ya por cambios anfotéricos de las proteínas e inversión de cargas de la membrana (*Burës y cols., (1967)*), o ya por efectos desestabilizadores de la membrana (*Stankovicova y Tole, 1980*); ambas acciones vistas en las distintas investigaciones citadas con la disminución del pH extracelular.

A su vez cambios en la cinética del ion  $\text{Na}^+$  de tercero o segundo orden han sido reportados por Keynes, (*1965*), al incrementarse las concentraciones intracelulares de  $\text{H}^+$ .

Por último, no podemos dejar de analizar el posible efecto que sobre los receptores de membrana pudiese ejercer la adición del CIH al medio celular. Silverstein y cols., (*1977*), relacionan la fagocitosis de las partículas de latex con la presencia de receptores no específicos en la membrana celular del macrófago.

Efectos del pH ácido han sido descritos por Scuka, (*1977*), quien concluye una disminución de las constantes de afinidad del complejo mediador-receptor de las uniones neuromusculares, por disminución del pH con decrementos en las corrientes iónicas de la placa terminal. Todo lo anterior nos permite postular un posible efecto pH-partícula-receptor de los macrófagos con cambios en las corrientes iónicas establecidas por la inducción de la fagocitosis.

Indiscutiblemente, investigaciones más profundas dirigidas a los aspectos anteriormente señalados son necesarias para esclarecer la existencia de las modificaciones eléctricas observadas en nuestros trabajos, pero si nos permiten concluir la existencia de cambios en los gradientes electroquímicos de transmembrana de estas células a la disminución del pH extracelular durante la fagocitosis inducida por el latex, planteándose la necesidad de tener en cuenta este parámetro en los procesos fisiológicos de la endocitosis.

## REFERENCIAS

- ANCHETA O. Y KOURÍ J. Estudio al microscopio electrónico de la población celular de la cavidad peritoneal de ratas durante la inflamación aséptica. *Revista Cenic*, 5, 13, 1974.
- BURES J., PETRAN M. AND ZACHAR J. Theoretical basis of electrophysiological phenomena in electrophysiological methods in biological research. Third edition, 23-39, Prague, 1967.
- GLYNN I. M. Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. *J. Physiol.* 160, 18, 1962.

- HUISER D. F. Electrophysiological studies on mammalian cells in cultures. Influence of Bicarbonate and pH on Membrane Potentials. *Pflügers Arch.* 325, 174, 1971.
- KEYNES R. D. Some further observations on the Sodium efflux in frog muscle. *J. Physiol. (London)* 178, 305, 1965.
- KOURI J., NOA M., DÍAZ B. AND NIUBÓ E. Hyperpolarization of rat peritoneal macrophages phagocytosing latex particles. *Nature*, 283, 868, 1980.
- NACCACHE P. H. Transport of Sodium, Potassium and Calcium across rabbit polymorphonuclear leukocyte membrane. Effect of chemotactic factor. *J. Cell. Biol.* 73, 428, 1977.
- SCHWARTZ A., LINDENMAYER G. E. AND ALLEN J. C. The Sodium-Potassium Adenosine triphosphatase. Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* 27, 3, 1975.
- SCUKA M. The effects of pH on the conductance change evoked by iontophoresis in the frog neuromuscular junction. *Pflügers Archiv* 369, 239, 1977.
- SILVERSTEIN S. C., STEINMAN R. M. AND COHN Z. A. Endocytosis. *Ann. Rev. Biochemistry* 40, 669, 1977.
- STANKOVICOVA T. AND TOLE S. Conduction of Action Potential isolated myelinated axon as influenced by changes in pH and membrane stabilizing agents. Proceedings of the International Union of Physiological Sciences XXVIII International Congress, 1980.
- VLEUGELS A. AND CARMELIET E. Refractory period in hypoxia and in high extracellular potassium in the embryonic heart. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 83, 152, 1975.
- WADDELL W. J. AND BATES R. G. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 49, 285, 1969.
- WHITTAM R. The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine Triphosphatase in relation to active cation transport. *Biochem J.* 84, 110, 1962.
- WOODBURY W. J. Regulation of pH in Physiology and Biophysics 923 Ruch-Patton W. S. Saunders Company, Philadelphia, 1960.