

Estudio al microscopio óptico y electrónico de la población celular de la cavidad peritoneal de ratas durante la inflamación aséptica

O. ANCHETA Y J. KOURÍ

Laboratorio de Microscopía Electrónica C.N.I.C., Habana.

Recibido en: Abril de 1973

ABSTRACT. An optical and electronic microscope study was made of the cell population obtained from the peritoneal cavity of rats in whom an aseptic inflammation was produced by implantation of Epon 812 laminae. The samples obtained were studied by several methods. Laminae of 24 hours and 7 days were studied in phase. Other laminae were introduced into a diffusion chamber, reimplanted into the original animal and extracted seven days later. [Other] laminae were placed for a period of 30 min in a saline solution which contained latex particles. These laminae were then also reimplanted into animal from which they had been taken. The remaining laminae were retired one each day over a period of 10 days from the peritoneal cavity of the rats. Diverse phenomena such as phagocytosis, cell fusions, degranulation, and cell degeneration, as well as possible transformation were observed. The significance of these phenomena are discussed.

RESUMEN. Se hace un estudio al microscopio óptico y electrónico de la población celular obtenida de la cavidad peritoneal de ratas a las cuales se les provocó una inflamación aséptica por la implantación de láminas de Epon 812. Las muestras obtenidas fueron estudiadas usando diversos métodos. Se estudiaron láminas de 24 horas y 7 días en fase, otras láminas fueron introducidas en cámara de difusión y reimplantadas en el mismo animal, extrayéndose a los 7 días, otras láminas fueron colocadas durante 30' en una solución de suero fisiológico, la cual contenía partículas de latex siendo reimplantadas nuevamente en el mismo animal. El resto permaneció en la cavidad peritoneal de las ratas, siendo retiradas día a día hasta 10 días. Se observaron diversos fenómenos tales como fagocitosis, fusiones, degranulación, degeneración celular, así como posibles transformaciones. Se hace un análisis de estos fenómenos dentro del contexto de la biología celular de este proceso.

INTRODUCCION

La inflamación aséptica es un modelo experimental muy interesante ya que brinda la posibilidad de estudiar fenómenos de varios tipos como por ejemplo, la fagocitosis, fusión celular, posibles transformaciones y hasta degeneración celular in vivo, bajo influencias hormonales y de todo tipo por métodos sencillos de microscopía óptica. (Georgiev, 1960 y Fox, 1970) y electrónica (Kourí y col., 1970); además se facilita la aplicación de técnicas citoquímicas (Ancheta y Kourí, 1972) y autorradiográficas. Más importante todavía es que permite sentar las bases para poder abordar en un futuro cercano aspectos sobre la patología celular.

El objetivo del presente trabajo es el estudio de los fenómenos planteados y su posible significación.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron un total de 45 ratas del tipo Wistar de ambos sexos con un peso de 150 a 200 grs. a las cuales se les introdujo en la cavidad peritoneal, en condiciones asépticas, 4 láminas de Epon 812.

A 5 de las ratas se les retiraron las láminas a las 24 horas, dos de las cuales se estudiaron inmediatamente en un microscopio óptico Carl Zeiss en fase y las otras dos láminas fueron colocadas en cámaras de difusión para las cuales se usó filtro milipore de 0.2 micras, siendo reintroducidas en el mismo animal. Las cámaras fueron retiradas 7 días más tarde, se revisaron cuidadosamente los milipore no encontrándose en ningún caso ruptura de los mismos.

A otras 5 ratas les fueron retiradas las láminas a las 24 horas y colocadas durante 20 minutos en una solución de suero fisiológico conteniendo partículas de latex de 0.8 micras; después fueron lavadas con suero fisiológico. Dos de estas últimas láminas se prefijaron inmediatamente y se procesaron para microscopía electrónica, las otras dos fueron reimplantadas en el mismo animal siendo retiradas nuevamente al cabo de 10 días.

A las ratas restantes se les extrajo las láminas a las 24, 48, 72 horas; 4, 5, 6, y 10 días. Tanto a las láminas obtenidas de las cámaras de difusión como las láminas que se encontraban libres en la cavidad peritoneal fueron procesadas para microscopía electrónica, siguiendo la técnica descrita en trabajos anteriores (*Kouri y col., 1970*).

Los bloques fueron cortados en el ultramicrotomo L.K.B. Ultratome III y los cortes plateados a amarillo claro se montaron sobre rejillas de 400 mesh sin membrana soporte.

Las reacciones citoquímicas se realizaron sobre los cortes usando la técnica de TSH proteinato de plata para revelar polisacáridos (*Thiery, 1967*) luego fueron montadas en rejillas sin membrana soporte a las cuales no se les realizó post-contraste.

Todas las preparaciones fueron observadas en los microscopios electrónicos HU-11A y HS-7.

RESULTADOS

En los resultados obtenidos observamos a las 24 horas de implantación un predominio de células mononucleares cuyas características ultraestructurales se corres-

pondían con los macrófagos o células fagocíticas (Fig. 1). Ya al segundo día se evidenciaron unas formas celulares (Figs. 2 y 3) con Retículo Endoplásmico Rugoso más prominente que el de los macrófagos, el cual contenía un material poco electrón denso en su interior, estas células variaban de redondeadas a alargadas, no observándose la presencia de fibras colágenas en el medio extracelular. Al quinto día se notó la presencia de células productoras de fibras, (Fig. 4) con Retículo Endoplásmico Rugoso prominente, ensanchado y conteniendo un material poco denso al haz electrónico similar al de las células anteriores. Al cabo de los diez días obtuvimos un predominio de células productoras de fibras (Fig. 5) donde el Retículo Endoplásmico Rugoso era muy prominente de canales estrechados y gran cantidad de fibras colágenas en el medio extracelular.

En las muestras procedentes de cámara de difusión con láminas de 24 horas de implantación había predominio de células redondeadas (Fig. 6); al cabo de 7 días se observó predominio de células alargadas (Fig. 7) las que presentaban características de fibroblastos al microscopio electrónico (Fig. 8).



FIG. 1. Macrófago del primer día. Se observa su núcleo (N) irregular, el retículo endoplásmico (RER) y su superficie celular irregular con abundantes proyecciones (flechas 12 500 x).

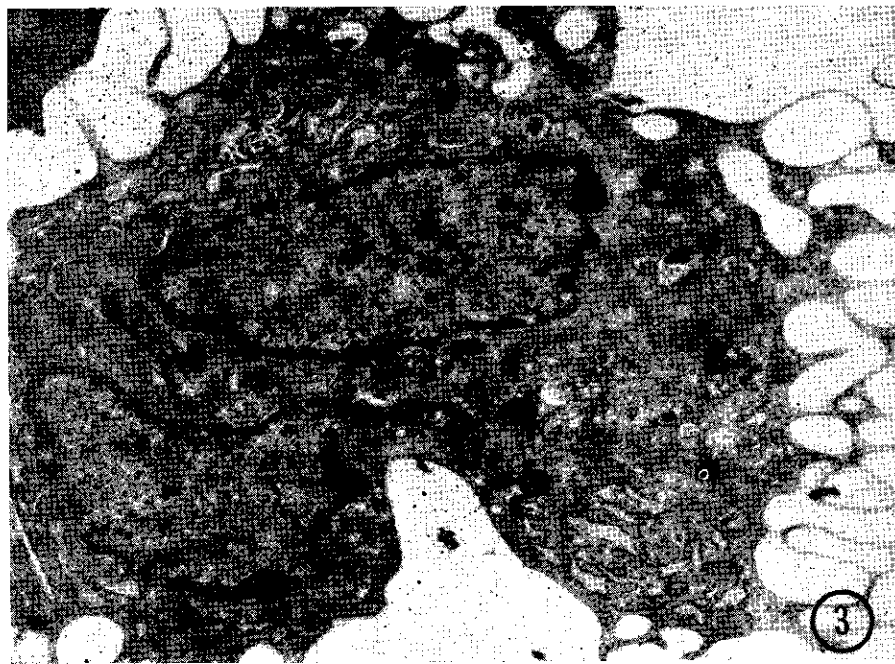


FIG. 2 y 3. En estas formas celulares se observa retículo endoplásmico rugoso (RER) abundante, de canales ensanchados y material poco electrón denso en su interior 12 500 x.



FIG. 4 Célula productora de fibras colágenas. Muestra su retículo endoplásmico rugoso (RER) abundante y con material poco denso en su inter

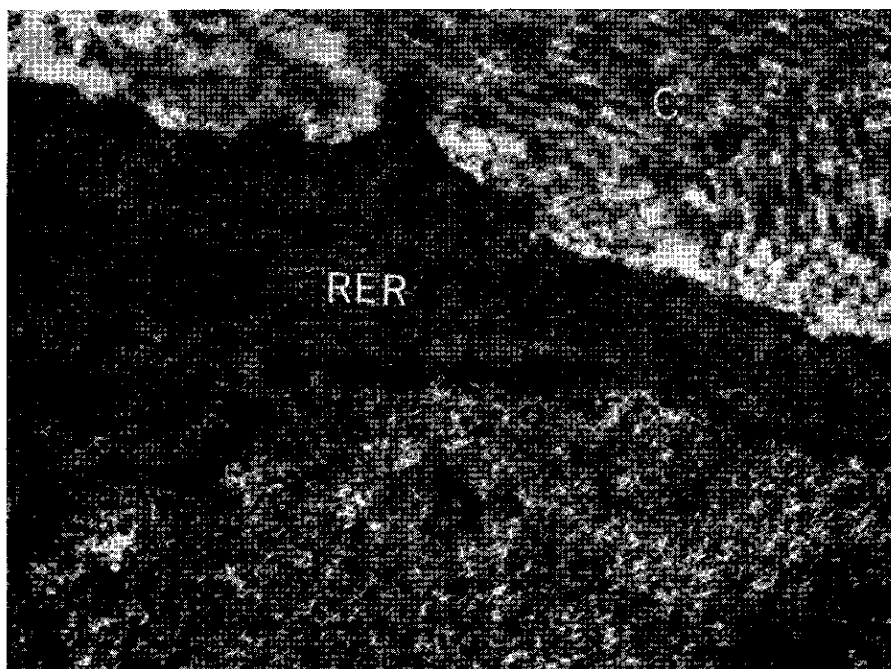


FIG. 5. Fibroblasto del décimo día. Se observa el retículo endoplásmico rugoso (RER) abundante y de canales estrechos, en el espacio extracelular gran cantidad de fibras colágenas (C) 25 000 x.

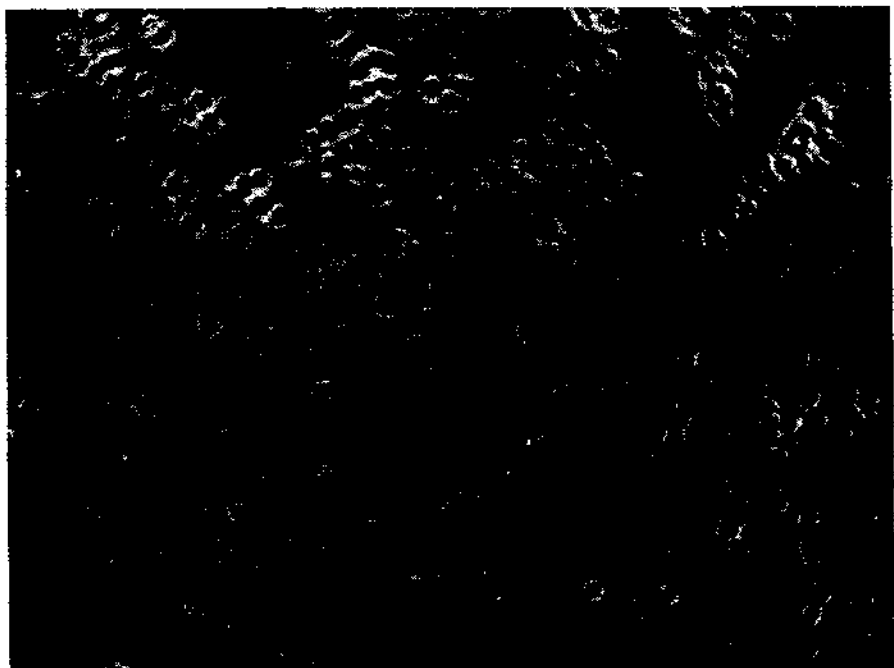


FIG. 6. Células mononucleares del primer día. Se observa predominio de células redondeadas. Obj. 16, oc. 8.

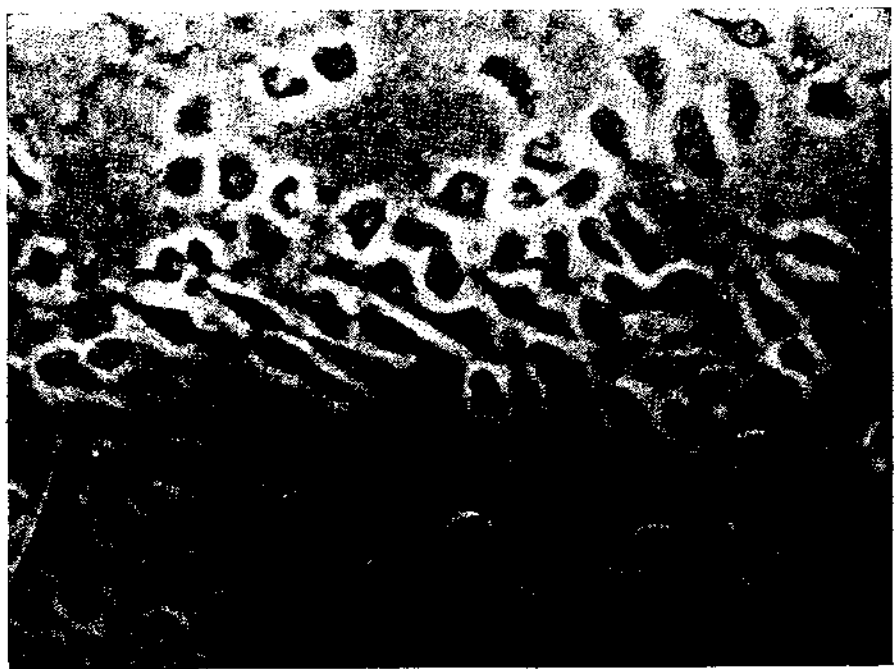


FIG. 7. Células alargadas, procedentes de la cámara de difusión. Se observa predominio de células alargadas. Obj. 40, oc. 8.



FIG. 8. Fibroblasto procedente de cámara de difusión. Muestra retículo endoplásmico rugoso (RER) prominente y de canales ensanchados 10 000 x.

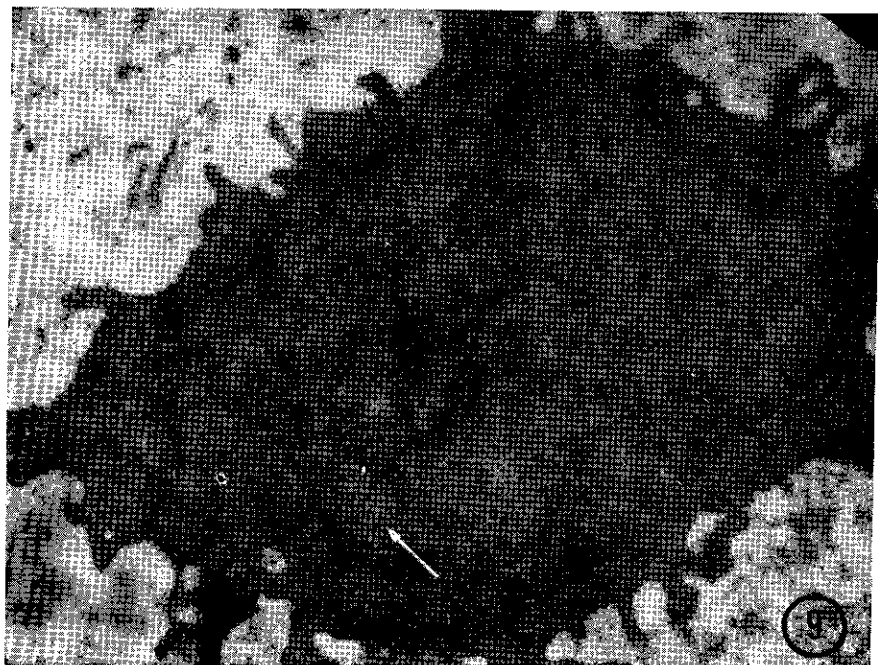
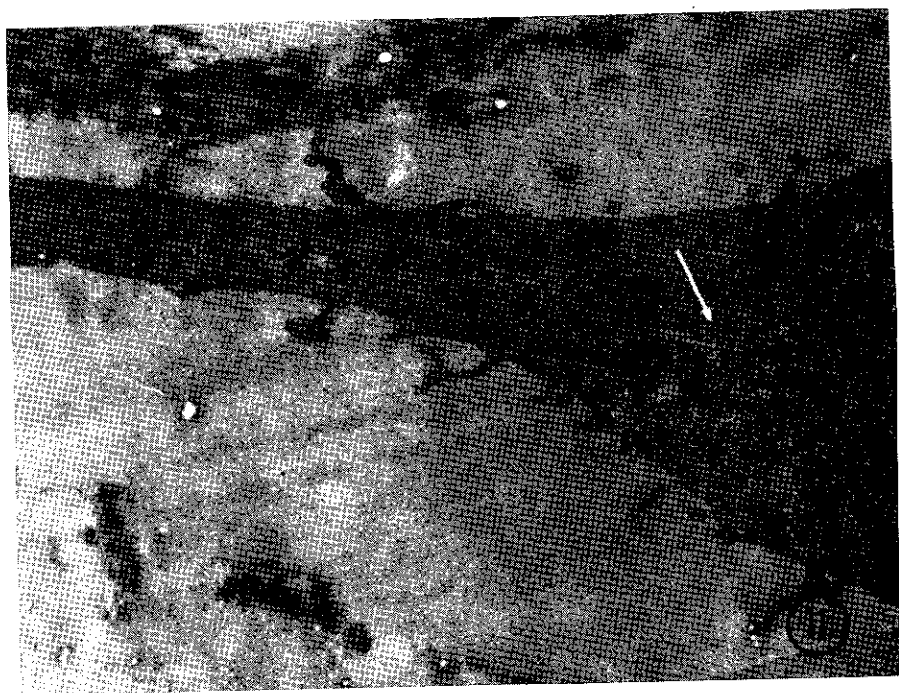
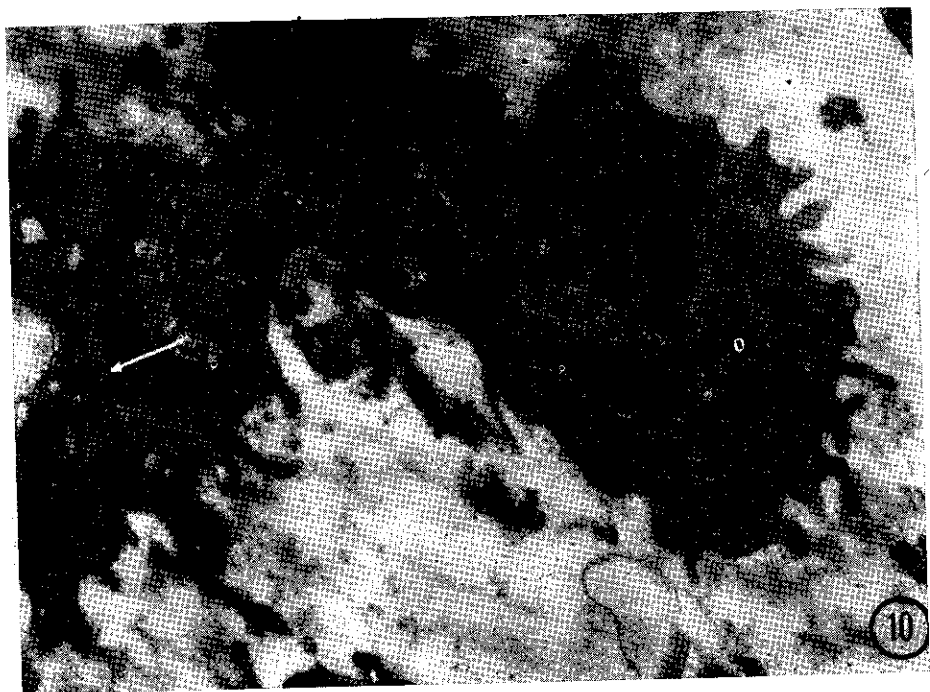


FIG. 9. Macrófago, se observa escaso producto de reacción (flechas) en forma de punteado negro disperso en el citoplasma 10 000 x.



Los resultados obtenidos en los estudios citoquímicos demostraron que los macrófagos (Fig. 9) presentaron escaso producto de reacción. En las formas redondeadas y alargadas con Retículo Endoplásmico Rugoso más prominente se observó aumento en el contenido del producto de reacción (Fig. 10), teniendo su máxima expresión en los fibroblastos (Fig 11), donde se observa gran cantidad de producto de reacción.

En las preparaciones en que se utilizó latex como marcador obtuvimos que las células iniciales las cuales contenían partículas fagocitadas presentaban las características de los macrófagos (Fig. 12) y al final de la experiencia, las células con partículas en su interior mostraban las características de los fibroblastos (Fig. 13).

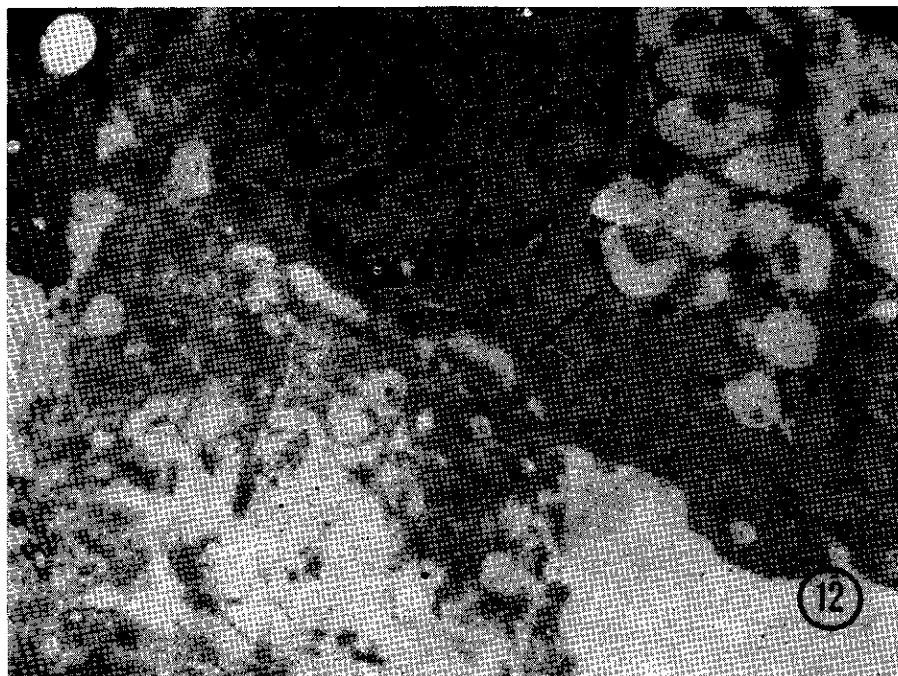


FIG. 12. Macrófago con partículas de latex en su interior (flecha) 10 000 x.

FIG. 10. Células con características intermedias entre macrófagos y fibroblasto, mostrando más abundante el producto de reacción (flechas). 10 000 x.

FIG. 11. Fibroblasto mostrando abundante producto de reacción (flechas) 10 000 x.

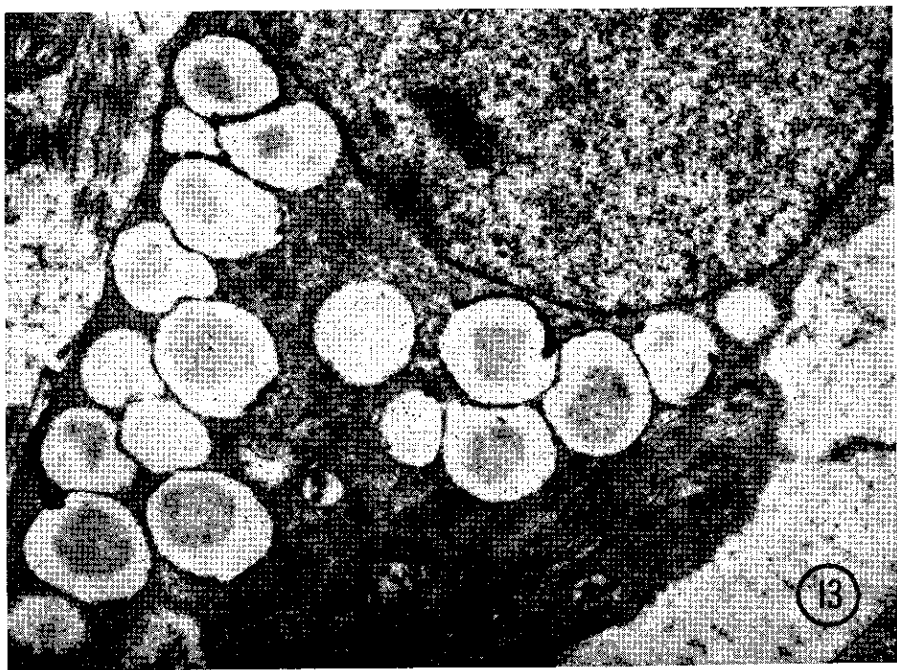


FIG. 13. Fibroblasto procedente de cámara de difusión. Se observan partículas de latex en su interior 12 500 x.



FIG. 14. Célula Cebada, obsérvese un gránulo al parecer siendo expulsado al medio (flecha) 10 000 x.

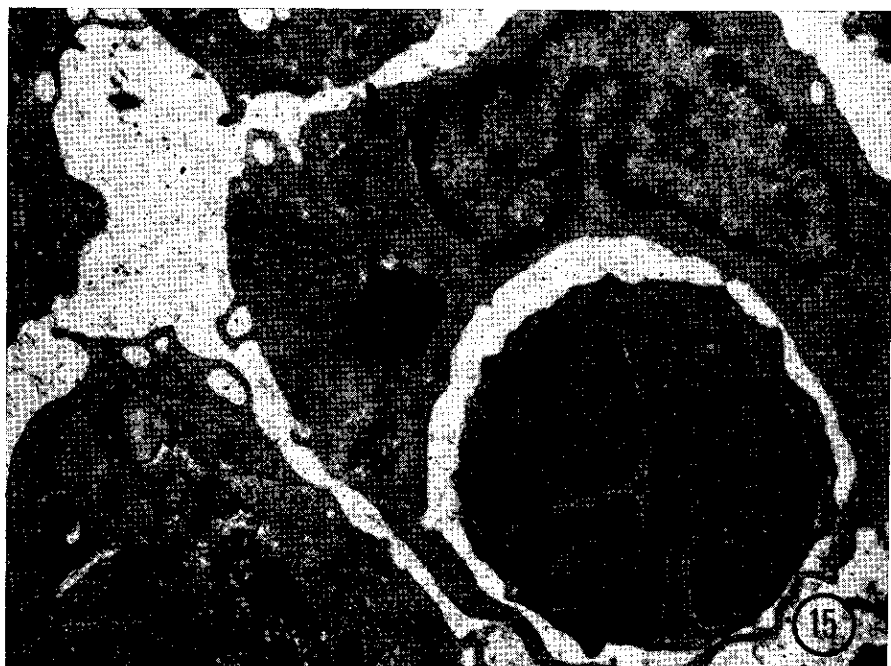


FIG. 15. Macrófago con una célula polimorfonuclear fagocitada. 10 000 x.



FIG. 16. Formación de células gigantes. Obsérvese la fusión celular (flecha) 12 500 x.

Otros hechos interesantes en nuestros resultados fueron la presencia en los primeros días de células cabadas al parecer degranulándose (Fig. 14) así como en todo momento observamos el fenómeno de fagocitosis (Fig. 15). También fue interesante la observación de fusiones celulares, presentando dichas células las características de los macrófagos (Fig. 16).

DISCUSION

Todos los fenómenos planteados que ocurren en el transcurso de la inflamación aséptica provocada por un cuerpo extraño en la gravedad peritoneal de ratas, los interpretamos como hechos lógicos del organismo en respuesta a una agresión.

Primero ocurre la migración celular hacia el punto afectado ya sean células propias de la cavidad o procedentes de la sangre (Nelson, 1969) luego allí en la zona de reacción a medida que el tiempo va transcurriendo, algunas células cebadas se degranulan siendo fagocitados dichos gránulos por los macrófagos y por las células allí existentes sirviendo de material energético para el metabolismo celular de las mismas (Ancheta y Kouri, 1971). Otras degeneran como es el caso de los polimorfos nucleares y son fagocitados por los macrófagos.

Los macrófagos se fusionan, como un mecanismo de formación de células gigantes hecho que consideramos lógico pues se trata de un proceso lento. Pensamos que en nuestras condiciones ocurre la transformación de células mononucleares fagocíticas (macrófagos) en células formadoras de fibras colágenas (fibroblastos) hecho este muy discutido y estudiado (Allgöwer y Hulliger, 1960; Carrel y Ebeling, 1926; Georgiev y Bachvarova, 1962; Grillo, 1963; Kouri y Ancheta, 1972; Rangan, 1967; Ross y Bendite, 1962; y Ross y Lilly White, 1965), pero todavía no esclarecido definitivamente.

En nuestros resultados de las láminas libres, la observación de células con características intermedias entre células fagocíticas y células productoras de fibras (Kouri y Ancheta, 1972) nos llevó a sugerir tal posibilidad, sin embargo, cabía la alternativa de contaminación inicial de las muestras, con fibroblastos procedentes del tejido conectivo, esto nos llevó a utilizar la cámara de difusión cuyos resultados apoyan aún más la posibilidad de transformación ya que partiendo de preparaciones donde la casi totalidad de las células son mononucleares fagocíticas, obtenemos al final una muestra donde predominan las células productoras de fibras colágenas.

El hecho de que en los macrófagos el producto de reacción en la demostración de polisacáridos, sea muy escaso y que esté aumentado en las células intermedias para ser máximo en los fibroblastos (Ancheta y Kouri, 1972) lo interpretamos como un dato que apoyaría la transformación de macrófagos a fibroblastos ya que la capaci-

dad de síntesis se va desarrollando por diferenciación hasta alcanzar su máximo en los fibroblastos.

Otro hecho y quizás el más significativo que apoya aún más la posible transformación, son los resultados obtenidos de las preparaciones tratadas con latex ya que en las muestras iniciales observamos dichas partículas en las células fagocíticas y 10 días más tarde el latex aparecía en el interior de las células productoras de fibras. No obstante estas evidencias, estamos llevando a cabo otras experiencias las cuales pensamos puedan concluir los planteamientos hechos.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a los compañeros María Eiena Ramos, María Cristina de la Rosa, Antonio Pazos, Jorge Agüero y Francisco Pino por la ayuda técnica prestada.

REFERENCIAS

- 1) ALLGÖWER M. AND HULLIGER L. Origin of Fibroblasts from mononuclear Blood cells: A study on in vitro formation of collagen precursor, Hydroxiprolin, in Buffy coat cultures. *Surgery* 47, 603, 1960.
- 2) ANCHETA O. Y KOURÍ J. Ultraestructura de la inflamación aséptica. *Revista Cenic (Ciencias biológicas)* 3, 111, 1971.
- 3) ANCHETA O. Y KOURÍ J. Contenido y Localización de polisacáridos en células de la inflamación aséptica. *Revista Cenic (ciencias biológicas)* 4, 33, 1972.
- 4) CARREL A. AND EBELING A. H. J. The fundamental properties of the fibroblast and the macrophage. II The macrophage. *J. Exp. Med.* 44, 285, 1926.
- 5) FOX M. O. Sobre el papel de los macrófagos en la defensa de los animales superiores. Tesis de Doctorado. Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba, 1970.
- 6) GEORGIEV I. Verfahren fur die supravitate untersuhieng der cent un lindege Webszellen coi aseptichest autzudung. *Comp. R. de la Acad Bulg. de Sc.* 13, 111, 1960.
- 7) GEORGIEV I. AND BACHAROVA M. A cytochemical study of alkaline phosphatase in aseptic inflammation. *Comp. R. de L'Acad Bulg. de Sc.* 15, 681, 1962.
- 8) GRILLO H. C. Origin of fibroblasts in Wound healing an autoradiographic study of Inhibition of cellular proliferation by local X-irradiation. *Annals of Surgery* 157, 457, 1963.
- 9) KOURÍ J., STOYANOV J., VALENTI J. Y ANCHETA O. Método para el estudio en Microscopía Electrónica de macrófagos peritoneales en capa unicelular. *Revista Cenic (ciencias biológicas)* 2, 111, 1970.
- 10) KOURÍ J. AND ANCHETA O. Transformation of macrophages into fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 71, 168, 1972.
- 11) NELSON D. S. Macrophages and Immunity, pag. 42, North-Holland Publishing Company Amsterdam, London, 1969.

- 12) RANGAN R. S. S. Origin of the fibroblastic growths in chicken buffy coat macrophage cultures. *Exp. Cell Res.* 46, 477, 1967.
- 13) ROSS R. AND BENDITE P. E. Wound healing and collagen formation III A Quantitative Radioautographic study of the utilization of proline H^3 in wounds from normal and Scorbutic Guinea Pig. *J. Cell Biol.* 15, 99, 1962.
- 14) ROSS R. AND LILLY WHITE J. W. The fate of buffy coat cells grown in subcutaneously implanted diffusion chambers. *Lab. Invest.* 9, 1568, 1965.
- 15) THIERY J. P. Mise en evidence des polysaccharides en Microscopie electronique *J. Microsc.* 6. 987, 1967.