

RELACION ENTRE EL POTENCIAL DE TRANSMEMBRANA Y LA CANTIDAD DE PARTICULAS FAGOCITADAS POR LOS MACROFAGOS PERITONEALES BAJO LA INFLUENCIA DE LA CONCAVALINA A

E. Niubó, B. Díaz, H. Leonard, M. Noa y J. Kourí

Departamento de Biología Celular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 9 de julio de 1986

Recibido: 23 de mayo de 1988

ABSTRACT. Electrophysiological studies of the transmembrane potential were carried out in rat peritoneal macrophages in order to characterize maximum potential change with the number of particles ingested during phagocytosis of yeast and Con A-coated-yeast as well as when macrophage is treated previously with Concanavalin A (Con A). Result showed that do not exist a lineal relation between transmembrane potential magnitude and the number of yeasts ingested.

RESUMEN. Se realizaron estudios electrofisiológicos de los potenciales de transmembrana en macrófagos peritoneales de rata con la finalidad de relacionar el cambio máximo de potencial con el número de partículas ingeridas durante la fagocitosis de levaduras y levaduras cubiertas con Concanavalina A (Con A), así como cuando el macrófago era tratado previamente con Con A. Los resultados muestran que no existe una relación lineal entre la magnitud del potencial de transmembrana y la cantidad de partículas ingeridas.

INTRODUCCION

La Concanavalina A (Con A) una lectina obtenida de las plantas, es causante de cambios funcionales y metabólicos en macrófagos¹ y en leucocitos polimorfonucleares.² Edelson y Cohn^{3,4} demostraron que la Con A aumenta la actividad endocítica de los macrófagos peritoneales residentes en la cavidad abdominal del ratón. Por otra parte, la fagocitosis de partículas de látex por polimorfonucleares es inhibida por las uniones específicas de la Con A a los receptores en la superficie de la membrana de estas células.⁵ Además, es conocido que la Con A aumenta el ensamblaje de los microtúbulos en polimorfonucleares.⁶

La unión de la Con A a receptores de membrana posiblemente está relacionada a cambios conformacionales transitorios de la membrana, pudiéndose de esta forma explicar tan diversos efectos.

Esta droga mitogénica evidentemente altera además los flujos iónicos intracelulares, se ha descrito bajo su efecto toma neta de K^+ en linfocitos tanto humanos como de ratón,⁷ así como de iones Ca^{2+} en linfocitos de camero.

La Con A reacciona con los sitios receptores sobre la superficie celular de la misma forma que los anticuerpos,⁸ siendo un modelo útil para estudiar los mecanismos de respuesta inmunológica, entre ellos, la fagocitosis mediada por receptores específicos.

Partiendo de que la fagocitosis de partículas se acompaña de cambios hiperpolarizantes del potencial de transmembrana^{9,10} y de que la Con A aumenta la toma de Ca y la actividad endocítica de los macrófagos peritoneales, se propuso con este trabajo comparar los

cambios eléctricos observados durante la ingestión de partículas de levadura por macrófagos previamente expuestos a Con A, con la ingestión de levaduras recubiertas con Con A, con la finalidad de investigar si existe una relación directa entre cantidad de partículas ingeridas y grado de hiperpolarización del potencial de transmembrana.

MATERIALES Y METODOS

Macrófagos. Las células se obtuvieron de la cavidad abdominal de ratas Wistar machos (200 a 250 g de peso) a las que se les colocó un disco de teflón estéril con iodoagar al 2 %, posteriormente se sacrificó el animal para extraerle el anillo a las 72 h.

Partículas a fagocitar. Para los ensayos de fagocitosis se emplearon levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) muertas con calor y suspendidas en Tyrode a una concentración de 10^7 levaduras/mL.

Las levaduras recubiertas con Con A (L-Con A) se prepararon adicionando a 1 mL de levaduras muertas (10^8 levaduras/mL) 1 mg de Con A incubándose durante 30 min a 25 °C y agitándose frecuentemente durante la incubación. Posteriormente se centrifugó tres veces durante 5 min a 450 g resuspendiéndose el pellet en 10 mL de Tyrode, para una concentración final de 10^7 levaduras/mL.

Ensayo de la fagocitosis. Se hicieron tres grupos de experiencias: Macrófagos incubados en 3 mL de solución Tyrode a 36 °C y pH 7,4 a los que se les adicionó 0,1 mL de la solución con levaduras, se

realizaron registros continuos de la actividad eléctrica desde el momento de la adición hasta 60 min después (células controles).

Macrófagos incubados en solución Tyrode con Con A (M-Con A) a concentración de 50 µg/mL durante 30 min a 15 °C, tiempo después del cual se lavó el preparado y finalmente se dejó en 3 mL de Tyrode a 36 °C, siendo inducida la fagocitosis con 0,1 mL de levadura.

Macrófagos incubados en 3 mL de solución Tyrode a 36 °C y pH 7,4 a los que se les adicionó 0,1 mL de levaduras recubiertas con Con A (L-Con A).

En los tres grupos experimentales se realizó registro del potencial de membrana antes de la adición de las partículas y una vez que éste era estable se adicionaron las levaduras, registrándose continuamente desde el momento de la adición hasta 60 min después.

Registro electrofisiológico. El potencial de membrana se registró a través de microelectrodos de vidrio llenados con KCl 3 mol/L, con diámetros y potenciales de punta menores de 0,5 µ y 5 mV respectivamente y resistencia entre 20 y 30 MΩ. Los microelectrodos fueron manipulados con un micromanipulador Leitz y acoplados a través de un compensador de alta impedancia a un preamplificador MEZ 8201. Una vez penetradas las células los potenciales se visualizaron en un osciloscopio VC-8 de doble canal y registrados por una cámara fotográfica PC-2A a velocidad de 10 mm/s.

Tamaño de las muestras. Se realizaron 10 experiencias controles (M + Lev) para validar el criterio de que la fagocitosis de levaduras se acompaña de cambios hiperpolarizantes semejantes a los observados durante la fagocitosis de partículas de látex.⁹ Para M-Con A y L-Con A se realizaron 20 experiencias de cada tipo. En la Tabla I sin embargo, aparece un número menor, ya que no se procesaron estadísticamente las muestras a las cuales no se les pudo hacer un registro continuo durante la fagocitosis por salida del electrodo de la célula o porque al final de la experiencia el potencial de punta del electrodo era mayor que el valor aceptable para estos registros. Además se despreció una experiencia en M-Con A y en L-Con A respectivamente porque los cambios del potencial fueron despolarizantes en vez de hiperpolarizantes durante la fagocitosis de partículas.

Índice fagocítico. La fagocitosis fue detenida con glutaraldehído en los tiempos promedios en que se producían los cambios máximos del potencial para cada grupo experimental, los cuales fueron 12 min para M-Con A y levaduras y 9 min para macrófagos con L-Con A.

El conteo de partículas se hizo en un microscopio de fase con inmersión en aceite.

Procesamiento estadístico. Los datos fueron procesados mediante el análisis de la varianza a través del test de planos factoriales.

RESULTADOS

La adición de levaduras a los macrófagos peritoneales produjo cambios hiperpolarizantes del potencial de membrana desde el primer minuto para alcanzar un máximo a los 13 min de la adición (12 ± 0,96 mV; 18,9 ± 1,37 mV en reposo y a los 13 min respectivamente), recobrando su potencial inicial a los 30 min.

La incubación de los macrófagos con Con A durante 30 min a 15 °C produjo una discreta despolarización del potencial de membrana en reposo (10,7 ± 0,54 mV), pero no fue posible registrar el

primer minuto de acción de la droga por la forma en que estaba diseñado el montaje experimental, ya que era preciso colocar el anillo con las células en la solución con la droga y a posteriori penetrar las células con el electrodo, de modo que no se pudo comprobar si el primer efecto de la Con A es una despolarización en el transcurso de 30 s, como ha sido descrito en los macrófagos alveolares de rata.¹¹ Una vez eliminada por lavado la Con A en exceso en la solución de incubación, fueron penetradas nuevamente las células y una vez estabilizado el potencial de membrana se adicionaron las levaduras, observándose al igual que en los macrófagos no recubiertos una desviación del potencial hacia valores más electronegativos aunque ligeramente menores en magnitud pero alcanzando su cambio máximo en un tiempo similar. La recuperación del potencial inicial, sin embargo, fue más lenta requiriendo 44 min

TABLA I

Cambios del potencial de membrana e índice fagocítico de macrófagos durante la fagocitosis de levaduras bajo el efecto de la Concanavalina A

célula y partícula	potencia de reposo	potencial post-lev al minuto	cambio máximo del potencial	índice fagocítico (%)	índice fagocítico (%)
macrófago + levadura	12 ± 0,96	13,3 ± 1,1	18,9 ± 1,37*		
M-ConA + levadura	10,7 ± 0,54	12,5 ± 0,31	16 ± 0,72*	40	0,37
macrófago + L-ConA	11,6 ± 0,8	13,8 ± 0,84	20 ± 1,2**	85	0,50

Los valores del potencial en mV están dados en media ± error estándar

* p < 0,05 con respecto a su valor en reposo

** p < 0,05 con respecto al cambio máximo en M-Con A

Los números entre paréntesis corresponden al tamaño de la muestra

M-Con A macrófagos tratados con Concanavalina A

L-Con A levaduras recubiertas con Concanavalina A

Lev levaduras muertas

La adición de levaduras recubiertas con Con A a macrófagos incubados en solución Tyrode se acompañó también de cambios hiperpolarizantes del potencial, pero estos fueron algo superiores en magnitud y se desarrollaron a mayor velocidad que en los dos grupos anteriores (M y M-Con A) con valores promedio de 20 ± 1,2 mV a los 9 min, recuperando su potencial de reposo a los 41 min.

De los 13 preparados estudiados en esta condición solamente uno mostró despolarización del potencial con la adición de L-Con A.

El índice fagocítico mostró que el número de levaduras ingeridas era superior en los macrófagos a los cuales se le adicionó L-Con A que a los que se les adicionó levaduras solas (M-Con A) (Fig. 1).

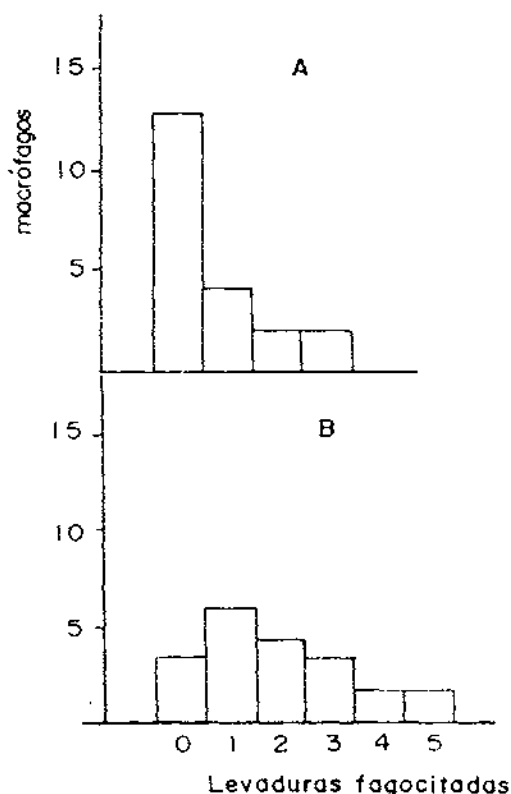


Fig. 1. Fagocitosis de levaduras por macrófagos tratados con: a. Concanavalina A y b. levaduras ozonizadas con Concanavalina A, por macrófagos no tratados

En la Tabla I se resumen los valores obtenidos en los tres grupos experimentales.

DISCUSION

Con este estudio se ha investigado la relación existente entre la magnitud del cambio eléctrico del potencial de membrana y la cantidad de partículas fagocitadas, empleando a la Con A con un doble propósito, como ligando a semejanza de como actuaría un anticuerpo⁸ y como activador de la fagocitosis a través de su efecto estimulante de las corrientes de calcio de membrana,^{12,13} las que han sido reconocidas por diversos autores como el gatillo que dispara los mecanismos implicados en el englobamiento de las partículas a través de su maquinaria contráctil.^{10,14,16}

Si bien ha sido establecido que la hiperpolarización de la membrana es el fenómeno eléctrico que acompaña a la fagocitosis,^{9,16,17} a la quiniotaxis¹⁴ y a la estimulación eléctrica de las células fagocíticas,¹⁸ sin embargo, no ha sido establecido cuantitativamente qué relación guarda el cambio máximo de voltaje de la membrana con estos fenómenos. Por ello se compararon los cambios del potencial del macrófago después de inducir la fagocitosis con levaduras en tres condiciones diferentes bajo el supuesto de que las cantidades de levaduras ingeridas por los macrófagos deben ser distintas.

La inducción de la fagocitosis con levaduras en los macrófagos que no han sido previamente tratados, son ingeridas a través de los

receptores inespecíficos, los cuales se encuentran distribuidos por toda la superficie de la membrana plasmática del macrófago facilitando de este modo que prácticamente todas las partículas que entren en contacto sean fagocitadas, mientras haya membrana disponible. Este es un evento que parece ocurrir a mayor velocidad que cuando la fagocitosis es mediada por receptores específicos y del mismo modo los cambios eléctricos se desarrollan a mayor velocidad.^{9,19}

Por otra parte, la ingestión de levaduras en M-Con A se ve limitada por la ocupación de sitios de membrana e ingestión por pinocitosis de la Con A, explicándose de este modo el menor índice en estas células comparadas con L-Con A. Sin embargo, la hiperpolarización máxima alcanzada y el tiempo requerido para que se desarrollen estos cambios no difieren significativamente entre M-Con A y levaduras en macrófagos no tratados. En contraste los macrófagos a los cuales se les indujo la fagocitosis con L-Con A mostrando una hiperpolarización máxima ligeramente superior a M-Con A, pero en un tiempo más breve que en las otras condiciones.

Estos resultados demuestran que no existe una relación lineal entre el grado de hiperpolarización de la membrana y la cantidad de partículas ingeridas, aun cuando parece evidente una relación directa entre ambas. A la par parece también posible que la velocidad a la que se desarrollan los cambios hiperpolarizantes sean una expresión de la velocidad a la cual son fagocitadas las partículas, siendo necesario realizar ensayos cinéticos para poder afirmar esta observación.

BIBLIOGRAFIA

1. Yasaka T. and Kambara T. *Biochem. Biophys. Acta*, 585, 229, 1979.
2. Rossi F., Zabucchi G. and Romeo D. Van Furth (ed.) *Mononuclear Phagocytosis in Immunity, Infection and Pathology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 441, 1975.
3. Edelson P.J. and Cohn Z.A. *J. Exp. Med.*, 140, 1 364, 1974.
4. Edelson P.J. and Cohn Z.A. *J. Exp. Med.*, 140, 1 387, 1974.
5. Berlin R.D. *Nature (London)*, 235, 44, 1972.
6. Hofftein S., Soberman R., Goldstein I. and Weissmann G. *J. Cell. Biol.*, 68, 781, 1976.
7. Owens T. and Gordin Japlan J. *Can. J. of Biochem.*, 58, 831, 1980.
8. Goldman R., Sharon N. and Lotan R. *Exp. Cell. Res.*, 99, 408, 1976.
9. Kourf J., Noa M., Díaz B. and Niubó E. *Nature*, 283, 868, 1980.
10. Okada Y., Tsuchiya W., Yada T., Yano J. and Yawo H. *J. Physiol.*, 313, 101, 1981.
11. Cameron A.R., Nelson J. and Forman H. *J. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80, 3 726, 1983.
12. Avendruk R. and Gunther Th. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97, 1 146, 1980.
13. Warner G. and Parker C.W. *Bochim. Biophys. Res. Commun.*, 65, 456, 1975.
14. Gallin E.K. and Gallin J.I. *J. Cell. Biol.*, 75, 277, 1977.
15. Axline S.G. and Reaven E.C. *J. of Cell. Biol.*, 62, 647, 1974.
16. Niubó E., Díaz B., Companioni M. y Kourf J. *Revista de Ciencias Biológicas*, 13, 131, 1982.
17. Díaz B., Niubó E., Companioni M., Ancheta O. and Kourf J. *T22 J. Exp. Cell. Res.*, 150, 494, 1984.
18. Gallin E.K., Wiederhold M.L., Lipsky P.E. and Rosenthal A.S. *J. Cell. Physiol.*, 86, 6 531, 1975.
19. Díaz B., Companioni M., Niubó E., Leonard H. y Kourf J. *Revista de Ciencias Biológicas*, 13, 282, 1982.