

HIPERPOLARIZACIONES Y OSCILACIONES DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ANTES DE INDUCIR LA FAGOCITOSIS. EFECTOS DEL CALCIO Y EL POTASIO

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

Lab. Electrofisiología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 23 de octubre de 1985

Recibido: 19 de marzo de 1986

ABSTRACT. The frequency with which appear fast hyperpolarization and oscillations following microelectrode input in macrophage as soon as changes of potential during 3 min in three different medium were studied. The elevation of extracellular K^+ concentration was accompanied with a larger frequency of hyperpolarization and oscillation, while a reduction of extracellular Ca^{2+} ion to avoid the oscillations in membrane potential. Cells in Tyrode standard solution showed greater hyperpolarization as soon as greater transmembrane potential (TP) once steady it; while in high K^+ concentration both values were lower than in the other two medium. Influence of ionic medium and possibilities of cell injure on electrical behaviour were discussed.

RESUMEN. Se estudió la frecuencia con que aparecen hiperpolarizaciones rápidas y oscilaciones del potencial de transmembrana (PT) siguiendo a la entrada del electrodo en los macrófagos, así como las variaciones del potencial durante 3 min de registro en tres medios iónicos diferentes. La elevación de la concentración de K^+ extracelular se acompañó con mayor frecuencia de hiperpolarizaciones y oscilaciones del PT, mientras que las bajas concentraciones de Ca^{2+} evitaron la aparición de oscilaciones del potencial. Las células incubadas en solución Tyrode estándar mostraron hiperpolarizaciones de mayor magnitud, así como los mayores PT una vez estabilizado éste; mientras que a concentraciones altas de K^+ ambos valores fueron inferiores comparados con los otros dos medios iónicos. Se discute la influencia del medio iónico en el comportamiento eléctrico de estas células y la posibilidad de daño celular por el electrodo.

INTRODUCCION

El estudio de las propiedades electrofisiológicas de las células fagocíticas (macrófagos) por diversos grupos¹⁻³ ha mostrado variabilidad de respuestas en células sometidas a condiciones semejantes, haciéndose necesario un análisis más profundo de estos fenómenos para su cabal interpretación una vez que se ha descartado toda posibilidad de errores de carácter metodológico por la minuciosidad técnica necesaria en células de tan pequeño diámetro. Acorde a los resultados obtenidos es de gran interés la variabilidad de potenciales eléctricos encontrados en una misma población de macrófagos que no han entrado en actividad fagocítica, estando condicionadas las respuestas posteriores por este potencial inicial. Las propiedades eléctricas de estas células a su vez están en dependencia del medio iónico que las rodea^{4,5} y por ello, el propósito de este trabajo es estudiar los potenciales de transmembrana de los macrófagos en reposo en tres medios iónicos diferentes analizando la ocurrencia de hiperpolarizaciones y oscilaciones inmediatas a la penetración del microelectrodo a través de la membrana, el nivel de estabilización del potencial y el posible daño celular ocasionado.

MATERIAL Y METODO

Se registró el comportamiento eléctrico de macrófagos peritoneales de ratas de machos de 250 g de peso, 72 h después de haberseles implantado un anillo de teflón

con ionoagar en cavidad abdominal. El anillo una vez extraído se incubó en uno de estos tres medios: solución Tyrode normal (STN); solución Tyrode con el doble de la concentración de KCl (13,5 mmol/L) o solución Tyrode con la mitad de la concentración de $CaCl_2$ (0,6 mmol/L) a 37 °C y burbujeada con una mezcla de oxígeno (95 %) y CO_2 (5 %).

Los tiempos de incubación en solución con aumento de la concentración de K^+ fue de 15 min y en bajas concentraciones de Ca^{2+} fue de 20 min, después de haberse determinado que los cambios del potencial de transmembrana se hacían manifiestos en estos tiempos sin variaciones adicionales.

La actividad eléctrica de estas células se registró por medio de microelectrodos de vidrio llenados con KCl 3 mol/L con resistencias entre 10 y 20 M Ω y potenciales de punta menores de 5 mV, acoplados a un amplificador de alta impedancia de entrada. El electrodo de referencia usado fue de Ag/AgCl/KCl igual a la media celda del electrodo de registro y sumergido en el baño.

La entrada en la célula se visualizó a través de un microscopio invertido de la marca Opton.

La actividad eléctrica se visualizó a través de un osciloscopio VC-8, acoplado a una cámara que filmaba continuamente el registro del PT.

Las células una vez penetradas por el electrodo se observaban durante 3 min, tiempo después del cual se

retiraban. Los registros que no tuvieron una salida compensada con la línea de referencia, no se procesaron.

Los parámetros de interés fueron:

Presencia de hiperpolarizaciones coincidentes con la entrada del electrodo en la célula, seguida o no por oscilaciones del potencial de membrana.

Oscilaciones solas, inmediatas a la penetración del electrodo.

PT inmediatamente después de las hiperpolarizaciones y oscilaciones.

PT al cabo de 3 min de registro.

Se comprobaron las medias de los valores del potencial una vez que cesaban las hiperpolarizaciones y las oscilaciones y el PT al final de los 3 min de registro.

RESULTADOS

Células incubadas en solución Tyrode normal

Las células incubadas en STN ($n = 24$) mostraron los valores más altos del PT con valores promedios de 12 mV.

Del total de células, 11 (45,8 %) mostraron hiperpolarizaciones inmediatas a la penetración, con potencial promedio de 20,5 mV y duración en media de 450 ms. De ellas 81,8 % mantenían estable o aumentaban su PT posterior a la hiperpolarización durante 3 min de observación y el 18,2 % de células restantes lo disminuían en 4 mV.

Solamente el 8,3 % de las células mostraron oscilaciones del PT con duración de 2,5 s concomitando en una de ellas hiperpolarización inicial.

El 50 % de las células ni se hiperpolarizan ni oscilan con la penetración del microelectrodo, manteniéndose estables o aumentando su PT el 75 % de ellas durante el tiempo de observación y el 25 % disminuyeron 2,3 mV en valor promedio.

En resumen, el 80 % de las 24 células observadas en STN estabilizan prontamente su PT o lo aumentan ligeramente después de la penetración. La figura 1 muestra los distintos tipos de respuestas eléctricas de los macrófagos incubados en STN al ser penetrados por el microelectrodo.

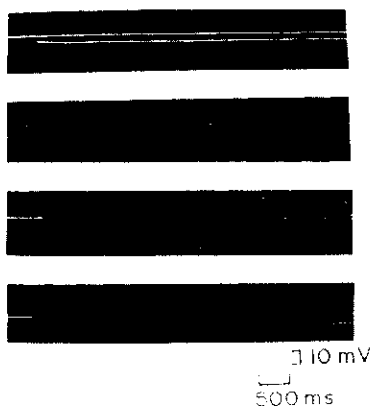


Fig. 1. Registros del PT de macrófagos incubados en STN (2,7 mmol/L de KCl y 2,5 mmol/L de $CaCl_2$) en el momento de la penetración del microelectrodo. Los dos primeros trazos se corresponden con hiperpolarizaciones rápidas. El tercer trazo muestra pequeñas oscilaciones del potencial estable desde el inicio del registro.

Células incubadas en altas concentraciones de K^+

Las células incubadas durante 15 min en solución de KCl 13,5 mmol/L ($n = 14$) mostraron PT promedio de 7 mV. De ellas el 78,5 % se hiperpolarizaron u oscilaron inmediatamente a la penetración del microelectrodo y solamente el 21,5 % presentaron un potencial estable desde el inicio del registro.

Las células que se hiperpolarizaban ($n = 5$) poseían PT promedio durante la hiperpolarización de 10 mV con duración de 550 ms, cayendo a valores de 5,6 mV inmediatamente después de la hiperpolarización y solamente una de ellas disminuyó en 1,6 mV al final del registro. Sólo el 14,2 de las células respondían con oscilaciones (sin hiperpolarizaciones) con PT promedio posterior a las oscilaciones de 6 mV, disminuyendo el 50 % de ellas 1 mV al final del registro y con duración de 8 s.

Las células que mostraron hiperpolarizaciones seguidas de oscilaciones (28,5 %) tenían PT promedio de 7,2 mV inmediato a las oscilaciones, manteniendo estable este valor el 75 % de ellas y el 25 % aumentó hasta 11 mV.

Como puede observarse el valor del potencial no se alteró significativamente porque el fenómeno eléctrico que lo antecedió fue hiperpolarización, oscilación o ambas. Sin embargo, las tres células que mostraron potenciales estables durante todo el tiempo de registro fueron significativamente mayores con valor promedio de 11 mV.

Células incubadas en bajas concentraciones de calcio

Las células incubadas durante 20 min en soluciones con bajas concentraciones del ion calcio (0,6 mmol/L) mostraron un PT promedio de 8,5 mV.

Del total de células ($n = 14$) la mitad desarrolló hiperpolarización inmediata a la penetración del microelectrodo y la otra mitad ni se hiperpolarizó ni mostró oscilaciones.

Las hiperpolarizaciones observadas en este medio iónico fueron en valor promedio de 9 mV, manteniendo estable este valor hasta el final del registro al 71,4 % de ellas y el 28,6 % aumentaron 5 mV en valor promedio.

Aquellas células que no se hiperpolarizaron, mostraron inmediatamente a la penetración un PT de 7,8 mV, manteniendo 71,4 % de ellas su valor original o aumentándolo hasta el final del registro y el 28,6 % disminuyeron en 3 mV en valor promedio.

En las Tablas I y II se resumen la ocurrencia de los eventos (%) y magnitudes de cada uno de ellos expresados en mV.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La gran variabilidad de valores del potencial de membrana registrado en células sometidas a las mismas condiciones, ha obligado en ocasiones a agruparlas por rangos de valores y estudiar por separado sus comportamientos ante la fagocitosis. Previamente se informó la mayor capacidad de respuesta de las células que poseían mayores PT previos a la fagocitosis que aquellas que eran menores; este comportamiento asociado a las variaciones de los iones Na^+ y Mg^{2+} en el medio extracelular. Otros autores, que han trabajado con cultivos de macrófagos también han informado variabilidad de los potenciales eléctricos^{6,7}, evidenciando que ello es compatible con dos niveles del potencial de reposo a semejanza de la fibra cardíaca de Purkinje⁸, reflejando subpoblaciones de macrófagos funcionalmente distintos o una sola población que puede

conmutar de un potencial de reposo a otro. Además, una población de macrófagos puede mostrar diferentes propiedades eléctricas según varíen las concentraciones de los cationes durante la maduración o el estado metabólico, dependiendo del estado de activación celular.

TABLA I
Total de células que se hiperpolarizan, oscilan o son estables al inicio del registro y comportamiento al final de 3 min

	Células que se hiperpolarizan	Células que oscilan	Células estables desde el inicio (%)	Células estables o que incrementan su PT al final	Células que disminuyen su PT al final
Tyrode	45,8 (24)	8,3 (2)	50 (12)	80 (19)	20 (5)
KCl 13,5 mmol/L	84,2 (9)	42,8 (6)	21,5 (3)	85,7 (12)	14,3 (2)
CaCl ₂ 0,8 mmol/L	50 (7)	0 -	50 (7)	85,7 (12)	14,3 (2)

Valores entre paréntesis : n

TABLA II
Media de los valores del potencial en distintos momentos del registro.

	PT de todas las células	PT durante la hiperpolarización	PT inmediato a la hiperpolarización	PT inmediato a las oscilaciones	PT inmediato a la hiperpolarización y la oscilación	PT de las células estables desde el inicio
Tyrode	12 (24)	20,5 (11)	9,6 (11)	17 (1)	9 (1)	12 (12)
KCl 13,5 mmol/L	7 (14)	10 (5)	5,6 (5)	6 (2)	7,2 (4)	11 (3)
CaCl ₂ 0,8 mmol/L	8,5 (14)	14 (7)	9 (7)			7,8 (7)

Todos los valores dados en mV
Valor entre paréntesis : n

No obstante, la presencia de fenómenos eléctricos de membrana como son las hiperpolarizaciones rápidas y oscilaciones del PT inmediatas a la penetración del electrodo en la célula, conllevó al cuestionamiento de su significado y obligó a descartar la posibilidad de daño celular a pesar del pequeño diámetro de punta del microelectrodo.

Como índice de buena vitalidad celular se decidió tomar la relación PT inmediato a la hiperpolarización u oscilación y el PT al final de 3 min de registro; los resultados muestran que en los tres medios iónicos ensayados el porcentaje de células que tiende a disminuir su PT con el tiempo es muy pequeño y que la gran mayoría permaneció estable o aun aumentó sin estímulo adicional, indicando que las células después de cambios provocados por el estímulo mecánico, alcanzan un nuevo nivel o estado estable del potencial de membrana posterior a posibles reajustes iónicos. Además, a estas células posteriormente se les suministró partículas de látex y respondieron con nuevas hiperpolarizaciones (resultados no mostrados en este trabajo). Parece más difícil admitir que los bajos PT que siguen a las hiperpolarizaciones puedan deberse a corrientes de fuga por la penetración del microelectrodo⁹.

También pudo constatar que las hiperpolarizaciones siguiendo a la entrada del microelectrodo es un fenómeno común en los tres medios iónicos estudiados, aunque el que con mayor frecuencia se acompañó con

hiperpolarización rápida y oscilaciones fue aquél que contenía concentraciones mayores del ion K⁺; así como que las magnitudes de las hiperpolarizaciones fueron menores que en los otros dos medios iónicos.

Hiperpolarizaciones espontáneas asociadas a un aumento de la permeabilidad a los iones K⁺ y caída simultánea de la resistencia de entrada, han sido encontrados previamente en macrófagos de exudados inducidos con aceite en ratón y curiel, así como en monocitos de sangre periférica humana^{11,10}. Eventos similares han sido reportados en células L donde las respuestas podían ser espontáneas o inducidas por estimulación eléctrica o mecánica¹⁰.

En las experiencias presentes pudo constatar que el aumento de las concentraciones extracelulares de K⁺ disminuyen la amplitud de estas respuestas hiperpolarizantes, coincidiendo con los hallazgos de Gallin y col.¹ y reforzando la opinión de que las hiperpolarizaciones son causadas por una elevación de la permeabilidad¹² al K⁺.

El nivel del potencial al cual las células se estabilizan obviamente está en dependencia del medio iónico que las rodea, mostrando su relación con las concentraciones de calcio y potasio fundamentalmente, como ya fue discutido previamente^{4,6,7,10}.

Finalmente se plantea que el potencial al cual se estabiliza la célula estará en dependencia del medio iónico extracelular, reflejando niveles diferentes del PT en medio de una situación dinámica en la cual pueden cambiar sus propiedades electrofisiológicas.

BIBLIOGRAFIA

- Gallin E. K., Wiederhold M. L., Lipsky P. E. and Rosenthal A. S. *J. Cell. Physiol.* 86, 653, 1975.
- Persechini P. M., Araujo E. G. and Oliveira-Castro G. M. *J. Memb. Biol.* 61, 81, 1981.
- Dos Reis G. A., Persechini P. M., Ribeiro J. M. C. and Oliveira-Castro G. M. *Biochim. et Biophys. Acta* 552, 331, 1979.
- Companioni M., Díaz B., Niubó E. y Kourí J. *Revista de Ciencias Biológicas* 12, 163, 1981.
- Niubó E., Díaz B., Companioni M. y Kourí J. *Revista de Ciencias Biológicas* 13, 121, 1982.
- Dos Reis G. A. and Oliveira-Castro G. M. *Biochim. et Biophys. Acta* 469, 257, 1977.
- Gallin E. K. and Livengood D. R. *J. Cell. Biol.* 85, 160, 1980.
- Gadsby D. C. and Cranfield P. F. *J. Gen. Physiol.* 70, 725, 1977.
- Okada Y., Tschichiya W. and Inouye A. *J. Mem. Biol.* 47, 357, 1979.
- Gallin E. K. and Gallin J. I. *J. Cell. Biol.* 75, 277, 1977.
- Berridge M. J. and Rapp P. E. *J. Exp. Med.* 81, 217, 1979.
- Kourí J., Díaz B., Noa M. and Niubó E. *Nature* 283, 888, 1980.