

# ACTIVIDAD ELECTRICA DE TRANSMEMBRANA DEL MACROFAGO PERITONEAL DE RATA SOMETIDO A BAJAS TEMPERATURAS Y EN MEDIOS LIBRES DE CALCIO

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

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

Recibido: 23 de octubre de 1985

Recibido: 19 de marzo de 1986

**ABSTRACT.** Electrical activity of rat peritoneal macrophages at 4 °C and after warmed at 37 °C in presence of phagocytosable latex particles was study. The cells at 4 °C presented low transmembrane potencial with values of 8,8 mV 6 min after the addition of latex particles. The cells, after being washed and returned to 37 °C, slowly increased their transmembrane potencial (15,6 mV at 17 min); a second latex addition did not influence either the necessary time or transmembrane potencial magnitude (15 mV at 18 min). Cells incubated in free-Ca<sup>2+</sup> medium and EDTA 4 mmol/L during 30 min, showed decline in resting potencial, and the addition of latex is followed by a gradual depolarization. It was discussed the possibility that the Na-K pump take apart in the restoring of resting potencial and the importance of the increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration for membrane hyperpolarizations development during phagocytosis

**RESUMEN.** Se hizo un estudio de la actividad eléctrica de los macrófagos peritoneales de rata incubados a 4 °C y después del calentamiento a 37 °C en presencia de partículas de látex. Las células a 4 °C presentaron bajos potenciales de transmembrana con un valor de 8,8 mV y despolarizaciones de hasta 5 mV a los 6 min de la adición de látex. Las células una vez lavadas y devueltas a 37 °C aumentaron lentamente su potencial (15,6 mV a los 17 min); una segunda adición de látex no influyó en el tiempo necesario ni en la magnitud del potencial de transmembrana alcanzado (15 mV a los 18 min). Las células incubadas durante 30 min en soluciones libres de calcio y EDTA 4 mmol/L, mostraron disminuciones del potencial de reposo y la adición del látex se acompañó de una gradual despolarización. Se discute la posibilidad de la participación de la bomba Na-K en la restitución del potencial de reposo y la importancia del aumento de las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> en el desarrollo de hiperpolarizaciones de membrana durante la fagocitosis.

## INTRODUCCION

Es indudable que la fagocitosis es un proceso biológico fundamental el cual se acompaña de múltiples cambios bioquímicos, morfológicos y eléctricos.

El proceso de la fagocitosis depende de la energía metabólica<sup>1</sup> y consta al menos de tres etapas separadas: unión de la partícula a la membrana plasmática; endocitosis de la partícula (formación del fagosoma) y fusión lisosoma-fagosoma (formación del fagolisosoma)<sup>2</sup>. De ellas al menos las dos últimas son dependientes de la temperatura y la primera aunque ocurre a bajas temperaturas, puede incrementarse linealmente con el aumento de ésta en dependencia del receptor involucrado<sup>3</sup>.

Actualmente existen demostraciones inequívocas de que las proteínas contráctiles están presentes en estas células no musculares<sup>4</sup>, sugiriendo que los microfilamentos pueden participar en el movimiento de la membrana plasmática durante la endocitosis<sup>5</sup>, existiendo además evidencias de que estos cambios morfológicos se acompañan de cambios del potencial de transmembrana (PT) como la traducción de variaciones en el transporte iónico a través de la membrana plasmá-

tica. Las corrientes iónicas involucradas durante el movimiento de estas membranas está asociado fuertemente al contenido de calcio al igual que en otros tejidos contráctiles<sup>6</sup> y el desarrollo de hiperpolarizaciones del potencial a corrientes de potasio sensible al calcio<sup>7,8</sup>. La presencia de despolarizaciones de membrana ante estímulos quimiotácticos<sup>9</sup>, eléctricos<sup>10</sup> y durante la inhibición de la fagocitosis<sup>11</sup>, sugieren un movimiento iónico previo al incremento de la permeabilidad para el potasio quien bien pudiera ser desencadenado en la endocitosis por la unión de la partícula con el receptor.

Teniendo en cuenta que la exposición a bajas temperaturas es capaz de inhibir los movimientos de membrana necesarios para la interiorización de las partículas y que el transporte activo de iones a diferencia del pasivo tiene un alto coeficiente de temperatura<sup>12</sup>, es propósito del presente trabajo estudiar los cambios eléctricos que acompañan a la unión partícula-receptor cuando ésta ha sido desagregada de la endocitosis.

## MATERIALES Y METODOS

**Macrófagos.** Las células mononucleares fagocíticas fueron obtenidas de la cavidad peritoneal de ratas

machos de 200 a 250 g de peso, por implantación de un anillo de teflón estéril con agar, el cual se retiraba 72 h después.

El anillo con el agar una vez extraído se lavaba en solución Tyrode a 4 °C, pH 7,4 burbujeado con una mezcla gaseosa que contenía 95 % de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> al 5 %. La solución se mantenía fría montando la cámara de perfusión en un receptáculo de poliespuma que contenía hielo y sal común.

**Partículas para inducir la fagocitosis.** Se utilizó como material fagocitable 0,1 mL de partículas de látex (Difco) de 0,8 μ de diámetro en una proporción 1:10 v/v lavadas en Tyrode, a una concentración de 2·10<sup>8</sup> partículas/mL.

**Montaje electrofisiológico.** Para los registros intracelulares se usaron microelectrodos de vidrio llenados con KCl 3 mol/L y resistencia entre 30 y 50 MΩ con potenciales de punta menores a 5 mV, conectados a un compensador de alta impedancia a la entrada de un preamplificador MEZ-8201, visualizándose los registros en la pantalla de un osciloscopio VC-8 y fotografiados con una cámara quimográfica PC-2A a velocidades de 5 y 10 mm/s, todos de la Nihon-Kohden.

**Ensayos de fagocitosis.** Las células una vez colocadas en la cámara de perfusión se mantenían por un periodo de 30 min a 4 °C, tiempo durante el cual se tomaban registros de diferentes células para establecer el PT antes de la fagocitosis. A los 30 min se adicionaban 2 gotas de látex, haciéndose registros continuos hasta 40 min después. Transcurrido este tiempo se retiraba el electrodo y se lavaba la preparación con Tyrode, dejándose en solución salina fisiológica (Tyrode) a 37 °C.

Los registros intracelulares se realizaron a partir del primer minuto de incubación.

**Células en soluciones libres de calcio.** Las células fueron incubadas durante 30 min en solución Tyrode libre de calcio y EDTA 4 mmol/L adicionando 0,5 mmol/L de Mg<sup>2+</sup> para asegurar que la concentración de este ion no disminuyera y Tris para mantener el pH en 7,4; la temperatura de incubación fue de 37 °C. Después de 30 min de incubación el potencial se estabilizaba procediéndose entonces a la adición de 0,1 mL de látex, haciéndose registros eléctricos durante 1 h.

**Procesamiento estadístico de las muestras.** Se comparó el PT antes y durante la fagocitosis de: 4 y 37 °C; 4 °C y Citocalasina B; así como los tiempos en que ocurren los cambios durante la fagocitosis a 4 °C y en presencia de Citocalasina B.

Los datos se procesaron haciendo uso del análisis de la varianza a través del test de planos factoriales y ulterior comparación con la prueba de rango múltiple de Duncan.

## RESULTADOS

**Células incubadas a 4 °C.** Las células incubadas a 4 °C durante 30 min mostraron potenciales de membrana de 8,8 mV, siendo significativamente menores que los valores encontrados previamente<sup>13</sup> en macrófagos incubados a 37 °C en iguales condiciones.

La adición de partículas de látex a estas células se acompañó de despolarizaciones del potencial que comenzaban en el primer minuto de la adición con valor promedio de 6,8 mV, para llegar hasta 5 mV a los 6 min

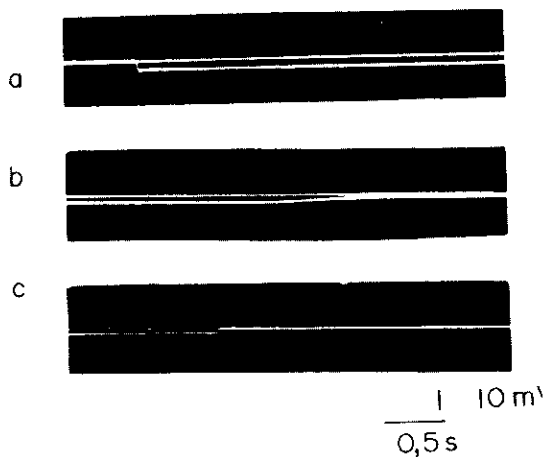
(Tabla I). Los registros eléctricos en momentos posteriores hasta 40 min no mostraron cambios adicionales del potencial, de modo que las células no recuperaron su valor inicial. La figura 1 muestra los cambios del PT a 4 °C antes y durante la incubación.

**TABLA I**  
Valores del potencial de macrófagos incubados a 4 °C y reposición a 37 °C antes y después de adicionar látex

Temperatura (°C)	PT durante la incubación (mV)	PT después del látex (mV)
37	13,2 ± 0,5 n = 170	
4	8,8 ± 1 n = 7	6,8 ± 0,7(1); 5 ± 0,8(6) <sup>a</sup>
Recuperación a 37 °C después de incubación a 4 °C	7,7 ± 0,9(8) n = 4	10 ± 0,7(1) <sup>a</sup> ; 15 ± 1,9(10) <sup>b</sup>
	7,8 ± 1,4(8); 9,6 ± 1,6(11); 15,6 ± 2,4(17)** n = 7	19 ± 0,3(1) <sup>c</sup> ; 22 ± 0,4(10) <sup>d</sup> n = 2

<sup>a</sup>diferencia significativa (p<0,05) con su potencial pre-látex

<sup>b</sup>diferencia significativa (p<0,05) con su potencial a los 8 min de incubación  
(1) tiempo de recuperación a 37 °C (min) a - 9, b - 18, c - 30 y d - 40



**Fig. 1.** Cambios del PT durante la incubación a 4 °C. a) PT de célula incubada en solución Tyrode a 4 °C durante 30 min, b) despolarización del PT dentro del primer minuto de la adición del látex y c) PT 40 min después de inducida la fagocitosis con látex, retirada del microelectrodo

**Reposición a 37 °C.** Una vez que las células se habían despolarizado al inducir la fagocitosis a 4 °C, se lavaban con solución Tyrode a 37 °C y mantenían a esta temperatura en solución fisiológica. Se observó que la recuperación del potencial era lenta, con valores de 7,8 mV a los 8 min, alcanzando su amplitud máxima a los 17 min de recuperación a 37 °C con valor promedio de 15,6 mV (Tabla I), no detectándose nuevas variaciones significativas del potencial hasta los 30 min; tiempo máximo de registro.

A dos de estas células se les adicionó látex después de permanecer 30 min a 37 °C, obteniéndose nuevas hiperpolarizaciones.

Para destacar la posibilidad de que el número de partículas de látex unidas a la membrana a 4 °C fuera suficiente, se decidió añadir nuevamente látex a partir de los 8 min de recuperación a 4 °C, observándose que éstas siguieron el mismo patrón de hiperpolarización del potencial tanto en tiempo como en magnitud que aquellas células que siguieron recuperándose sin nueva adición de látex. La figura 2 muestra los cambios del PT de una célula recuperándose a 37 °C.

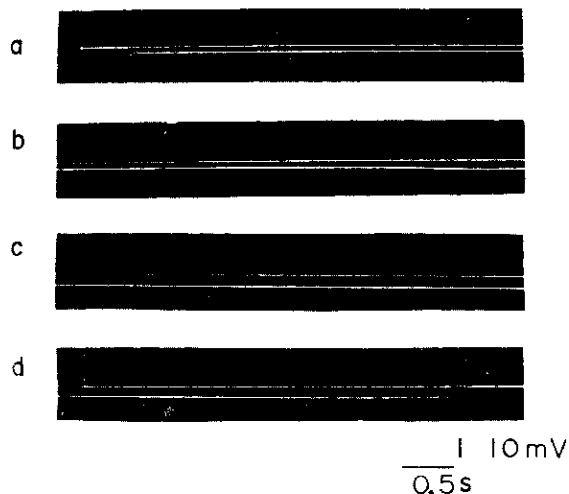


Fig. 2. Cambios del PT durante 20 min de recuperación a 37°C de una célula a la cual se le había inducido la fagocitosis a 4°C. a) PT a los 5 min de recuperación a 37°C, b y c) recuperación a los 10 y 16 min respectivamente a 37°C y d) retirada del electrodo a los 20 min de recuperación a 37°C

**Medios libres de calcio.** Las células incubadas por periodos de 30 min en solución Tyrode de calcio mostraron disminuciones del PT hasta valores de 9,4 mV. La adición de partículas de látex a estas células se acompañó desde el primer minuto de cambios despolarizantes, alcanzando la máxima despolarización a los 16 min con un valor de 6 mV (Tabla II). En los 60 min siguientes a la adición de las partículas, estas células no recuperaron su potencial pre-látex.

**TABLA II**  
Cambios del potencial de macrófagos en soluciones libres de calcio

	PT antes del látex	PT después de la adición del látex (mV)
Tyrode libre de Ca <sup>2+</sup> + EDTA 4 mmol/L	9,4 ± 0,6	8 ± 0,5(1); 6,8 ± 0,5(5); 6 ± 0,6(16)
	n = 95	n = 10

diferencia significativa (p < 0,05) respecto a su potencial pre-látex  
( ) tiempo en minutos

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que el ion calcio está involucrado en los eventos eléctricos que acompañan a la fagocitosis, así como la participación de la bomba de Na<sup>+</sup> en el mantenimiento del potencial de estas células.

Los bajos PT observados posteriormente a los 30 min de incubación a 4 °C parecen revelar en estas células la presencia de una bomba de sodio electrogénica, la cual contribuye con 6 mV al PT en reposo. No obstante, esta despolarización pudiera reflejar la acumulación de K<sup>+</sup> en el espacio extracelular consecuente a la inhibición de una bomba electroneutra, conllevando que la relación K<sub>o</sub>/K<sub>i</sub> sea menor que en condiciones normales, disminuyendo de esta forma el PT<sup>14</sup>.

Gallin y Livengood<sup>15</sup>, han encontrado en macrófagos del bazo de ratón despolarizaciones de hasta 6 mV cuando ellas fueron tratadas con ouabaina, concluyendo que ellas reflejan más la contribución de la bomba en condiciones de estado estacionario que el aumento de la concentración del K<sup>+</sup> extracelular. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por estos autores se ha encontrado que la exposición de los macrófagos peritoneales de ratas a medios son aumentos de la [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> hasta 13,5 mmol/L, producen cambios despolarizantes de 6 mV<sup>16</sup>. No obstante estos autores registraron los cambios de resistencia de membrana durante la inhibición con ouabaina observando que sólo del 3 al 5 % de las células disminuían su resistencia, lo cual apoya el punto de vista de que las despolarizaciones observadas son el resultado de la inhibición de la bomba Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> y no una acción detergente selectiva.

Previamente se informó que cuando la fagocitosis es impedida por un inhibidor metabólico (2 deoxiglucosa)<sup>11</sup> o por un desacoplador del citoesqueleto (Citocalasina B)<sup>11</sup>, la respuesta eléctrica ante un estímulo fagocítico es una despolarización del PT en el primer minuto de adicionadas las partículas fagocitables. Esta despolarización se interpretó como el movimiento iónico de membrana que acompaña a la unión de la partícula al receptor de membrana, ya fueran éstos específicos o inespecíficos. La presencia de despolarizaciones del PT al inducir la fagocitosis a 4 °C en cuya condición puede ocurrir la unión pero no el englobamiento de la partícula<sup>17</sup>, apoya fuertemente el planteamiento anterior.

Las despolarizaciones observadas en presencia de látex a 4 °C no difieren en magnitud ni en el momento de aparición de aquéllas vistas en medios con Citocalasina B<sup>11,18</sup>, sin embargo, difieren significativamente en el tiempo necesario para alcanzar la máxima despolarización, siendo mucho más prolongadas a 4 °C, lo que podría implicar la existencia de un componente iónico adicional en esta condición.

La demostración de que a 4 °C las transformaciones necesarias para que las proteínas contráctiles de los macrófagos en la emisión de pseudópodos y englobamiento de las partículas están imposibilitados<sup>19</sup> junto a la ausencia de cambios hiperpolarizantes del potencial, son un nuevo índice de la posible relación existente entre la actividad fagocítica y el desarrollo de corrientes hiperpolarizantes.

Romero<sup>20</sup> ha señalado que la incubación de eritrocitos a 4 °C impide la entrada de calcio a estas células; si esto fuera válido también para los macrófagos, el aumento de la permeabilidad para el K<sup>+</sup> dependiente del

calcio se vería impedida y en consecuencia no se desarrollarían los cambios hiperpolarizantes, los cuales estuvieron ausentes en estas experiencias.

Los cambios del PT durante la recuperación a 37 °C los cuales se desarrollaron mucho más lentamente y que sólo sobrepasan en unos pocos milivoltios el valor medio observado antes de la fagocitosis en células incubadas en Tyrode a 37 °C<sup>13</sup>, probablemente estén asociados a la activación de la bomba y a movimientos iónicos de transmembrana restituidores de las concentraciones a la normalidad y no a cambios de permeabilidades que acompañan a la fagocitosis. Por lo expuesto anteriormente, se postula que los cambios observados en el PT después de recalentar 17 min a 37 °C están a conductancias activas relacionadas a la bomba de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, la cual es capaz de restituir el PT mucho antes que el contenido iónico retorne a la normalidad.

Page y Storn<sup>21</sup> encontraron que el músculo cardíaco sometido a Ringer frío, recobraba su potencial de membrana en 9 min cuando se calentaba a 28 °C, mientras que el contenido iónico tardaba 30 min en retornar a la normalidad.

Además de las consideraciones hechas, Romero<sup>20</sup> ha señalado que cuando las células rojas son sometidas a incubación a 4 °C y posteriormente son restituidas a temperaturas crecientes, la concentración del calcio intracelular aumenta poco en los primeros minutos y comienza a ser realmente considerable a partir de los 30 min.

Al igual que otros autores<sup>7,22-24</sup>, en trabajos previos<sup>13,16</sup> se ha señalado y discutido la importancia del calcio en los fenómenos de membrana relacionados con la fagocitosis y en el subsecuente desarrollo de hiperpolarizaciones, así como el retardo que ocurre en los cambios hiperpolarizantes que acompañan a la fagocitosis de partículas de látex en medios deficientes en calcio<sup>16</sup>, a lo cual se suma ahora la ausencia de hiperpolarizaciones en medios libres de este ion, todo lo cual concuerda y apoya el planteamiento de que estas células requieren la entrada de calcio previo al desarrollo de hiperpolarizaciones y probablemente necesiten al menos 20 min de recalentamiento a 37 °C antes de recuperar su equilibrio iónico perdido a 4 °C, para encontrarse nuevamente en condiciones, ante un estímulo fagocítico, de desarrollar hiperpolarizaciones dependientes de corrientes de K<sup>+</sup> sensibles al Ca<sup>2+</sup>.

En resumen, la inhibición de la bomba de Na<sup>+</sup> por la exposición de las células a bajas temperaturas resultó en un decremento del PT. Este fue seguido de nuevas disminuciones o despolarizaciones del PT con la adición de partículas de látex, sugiriendo que éste es el evento eléctrico que acompaña a la adhesión de la partícula al receptor. Los aumentos del potencial durante los primeros 30 min de reposición de las células a 37 °C parecen estar en función de la actividad de la bomba Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> más que a los cambios de la P<sub>K</sub> sensibles al calcio durante la fagocitosis.

## BIBLIOGRAFIA

- Oren R., Farnham A. E., Saito K., Milowsky E. and Karnsnoy M. L. *J. Cell. Biol.* 73, 655, 1979.
- Hoff S. F. *J. Cell. Biol.* 70, 127, 1976.
- Michl J. *J. Cell. Biol.* 70, 286, 1976.
- Pollard T. D. and Weihing R. A. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 2, 1, 1974.
- Malawista S. E., Gee B. L. and Bensch K. G. *Yale J. Biol. Med.* 44, 286, 1971.
- Gallin J. I. and Rosenthal A. S. *J. of Cell. Biol.* 62, 594, 1974.
- Gallin E. K., Wiederhold M. L., Lipsky P. E. and Rosenthal A. S. *J. Cell. Physiol.* 86, 653, 1975.
- Henkard M. P. and Nelson P. G. *J. Gen. Physiol.* 73, 655, 1979.
- Gallin E. K. and Gallin J. I. *J. of Cell. Biol.* 75, 277, 1977.
- Gallin E. K. *J. of Cellular Physiol.* 107, 21, 1981.
- Díaz B., Niubó E., Companioni M., Ancheta O. and Kouri J. *Exp. Cell. Res.* 150, 494, 1984.
- Hodging A. L. and Keynes R. D. *J. Physiol.* 128, 28, 1955.
- Kouri J., Noa M., Díaz B. and Niubó E. *Nature (London)* 283, 868, 1980.
- Whittembury G. *J. Gen. Physiol.* 48, 699, 1965.
- Gallin E. K. and Livengood D. R. *Am. J. Physiol.* 245, C184, 1983.
- Companioni M., Díaz B., Niubó E. and Kouri J. *Rev. de Ciencias Biológicas* 12, 123, 1981.
- Griffin F. M., Griffin J. A., Leider J. E. and Silverstein S. C. *J. of Exp. Med.* 142, 1263, 1975.
- Stossel T. P. and Hartwig J. H. *J. of Cell. Biol.* 68, 602, 1976.
- Niubó E., Díaz B., Companioni M. and Kouri J. *Rev. de Ciencias Biológicas* 13, 131, 1982.
- Romero P. J. and Whittam R. J. *Physiol.* 214, 481, 1971.
- Page E. and Storn S. R. *J. Gen. Physiol.* 48, 957, 1965.
- Persechini P. M., Araujo E. G. and Oliveira-Castro G. M. *J. Membr. Biol.* 61, 81, 1981.
- Dos Reis G. A. and Oliveira-Castro G. M. *Biochim. et Biophys. Acta* 469, 257, 1977.
- Gallin E. K. Past and Future. Academic Press. Inc. 29 a 46, 1982.