

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

## Actividad fagocitaria in vitro de macrófagos de ratones con bagazosis

Por los Dres.:

HILDA PAUSTE\*, VLADIMIR RAMOS\*\* y TERESITA RODRIGUEZ\*\*\*

Pauste, H. y otros. *Actividad fagocitaria in vitro de macrófagos de ratones con bagazosis*. Rev Cub Med 21: 3, 1982.

En los cultivos de macrófagos obtenidos del exudado peritoneal de ratones que habían inhalado polvo de bagazo, se encontró una menor actividad de fagocitosis de inmunocomplejo, comparado con los animales que sólo inhalaron salina. También se encontró una disminución en el número de células mononucleares con reacción positiva de fosfatasa ácida en las células extraídas de la cavidad peritoneal, la cual podría explicar la diferencia en las cantidades de material fagocitado por las células adheridas al vidrio.

### INTRODUCCION,

En nuestro laboratorio encontramos recientemente una disminución en el número de células productoras de anticuerpos en ratones con bagazosis inducida experimentalmente.<sup>1</sup>

La respuesta inmunológica normal requiere de la interacción de los linfocitos T, los linfocitos B y de los macrófagos.<sup>4</sup> Si el funcionamiento de alguna de estas células se altera, también se altera la respuesta inmunitaria, como ocurre en el transcurso de numerosas enfermedades virales, en las cuales por el efecto producido sobre los linfocitos, o sobre los macrófagos se produce depresión inmunológica.<sup>5</sup> En la infección con el virus del sarcoma de Maloney, el macrófago es la célula responsable de la depresión, e *in vitro* provoca una disminución de la transformación blastoide producida por la fitohemaglutinina sobre las células esplénicas de ratón.<sup>6</sup>

En este trabajo, nos hemos propuesto estudiar algunas características de los macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones con bagazosis inducida experimentalmente, para explorar si se encuentran alterados.

\* Médica investigadora.

Residente de 2do.

Médico investigador.

## MATERIAL Y METODOS

Se usaron ratones Swiss de 3 a 4 meses de edad; procedentes de nuestro bioterio. El polvo de bagazo se obtuvo en una fábrica de papel. Se tomó el bagazo tal como se recibe del central azucarero, antes de ser procesado por la fábrica. Se suministró el bagazo o la salina a los animales controles como se describió en nuestro trabajo anterior.<sup>3</sup>

Se obtuvo el exudado peritoneal al inyectar 5 ml de medio Eegle, con 25 unidades de heparina, 100 unidades de penicilina y 100  $\mu$ g de estreptomina por ml de medio. Se unió el exudado extraído de dos ratones con igual tratamiento (bagazo o salina) y se sembró en placas de Petri, las cuales se mantuvieron 4 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5% en el aire. A las 4 horas se aspiró el medio, se lavaron las placas 3 veces con salina a 37°C, para eliminar las células no adheridas al fondo. Se añadió igual cantidad de medio Eegle con penicilina y estreptomina, suplementado con aminoácidos no esenciales y suero de ternero al 10% (V/V). A las 48 horas de iniciado el cultivo, se cambió el medio por uno fresco de igual composición, al que se le adicionó 20  $\mu$ g de inmunocomplejo marcado con <sup>125</sup>I por cada ml. El inmunocomplejo fue preparado con IgG de conejo y suero de cabra inmunizada con IgG de conejo (IgG-Ac) y con seroalbúmina bovina y suero de conejo antisero- albúmina (SAB-Ac). La fagocitosis y la medición del material fagocitado, se realizó como se describe en el trabajo publicado por C. Finlay y otros.<sup>4</sup> Para la fagocitosis de glóbulos rojos de carnero, se añadió a cada placa 0, 2 ml de una suspensión de glóbulos rojos de carnero marcados con <sup>51</sup>Cr y cubiertos con anticuerpos de ratón contra los glóbulos de carnero (GRC-Ac). Antes del lavado final con salina los glóbulos rojos fueron usados con solución tibia de NH<sub>4</sub>Cl al 0,83% (P/V).

Para los exámenes históricos de las células adheridas al vidrio, se empleó la coloración de May-Grünwald Giemsa. La detección histoquímica de la fosfatasa ácida se realizó por el método de Gomori<sup>78</sup> en el exudado peritoneal de 5 ratones tratados con bagazo y 5 tratados con salina y en las células adheridas a láminas cubreobjetos colocadas en el fondo de las placas de Petri, durante las 48 horas de cultivo.

En las experiencias de fagocitosis, se procesaron 4 ó 5 placas de Petri con exudado de ratones tratados con bagazo e igual número de placas del exudado de animales tratados con salina (2 ratones por cada placa). El número de células en los exudados se contó en una cámara de Neubauer. Para comparar las cantidades de células, se usó el test no paramétrico de Rosem- boum modificado.<sup>9</sup> Para comparar la cantidad de material radiactivo fagocitado, expresado en cuentas por minuto (CPM), se usó el test de la t de Student. El número de células fosfatasa positiva en los exudados, fue comparado mediante el test de X<sup>2</sup>.

## RESULTADOS

### *Fagocitosis de IgG-Ac*

Los animales se sacrificaron 4 días después de la segunda administración de la suspensión de bagazo o la solución salina. La cantidad de inmunocomplejo fagocitado resultó significativamente mayor ( $p > 0,01$ ) en los cultivos del exudado normal, que en los cultivos de los animales que inhalaban bagazo (cuadro I). El número total de células en el exudado de estos ratones fue inferior al número de células en los exudados normales ( $p < 0,005$ ). No se ajustó la concentración de células antes de sembrar.

### *Fagocitosis de SAB-Ac*

Dos grupos de animales fueron sacrificados cuatro días después de la segunda instilación y el otro grupo se sacrificó doce días después. En el primer grupo sacrificado al cuarto día, la concentración de células se ajustó a  $10^6$  células por ml. Las cantidades de células en los exudados no tuvieron diferencias significativas. La media de las CPM de los cultivos normales fue mayor, pero la diferencia tampoco resultó significativa (cuadro I). En el otro grupo del cuarto día, no se ajustó el número de células antes de sembrar. Tampoco se encontró diferencias en el número total de células entre ambos tipos de exudados. La cantidad de SAB-Ac fagocitada fue superior en los cultivos de los ratones controles ( $p > 0,01$ ).

En el grupo estudiado a los doce días de administrado el bagazo, el número de células en las mezclas de exudado obtenidas de los ratones tratados con bagazo fue inferior ( $p < 0,005$ ). La cantidad de inmunocomplejo fagocitado fue superior en los cultivos de los controles ( $p > 0,01$ ). Aunque no hubo grandes diferencias en las medias del número de CPM de los dos tratamientos, el número de CPM más alto en los ratones tratados con bagazo fue inferior al número de CPM más bajo de los controles (cuadro I).

CUADRO I

Inmunocomplejo	FAGOCITOSIS DE INMUNOCOMPLEJO IN VITRO		P
	Media CPM/	Placa de Petri Salina $9 \times 10^5 \pm$	
IgG-Ac	3 087 $\pm$ 990	753	0,01
SAB-Ac	4 604 $\pm$ 1 557	5 372 $\pm$ 1 116	ns
	6 547 $\pm$ 2 400	10 756 $\pm$ 1 663	0,01
	4 146 $\pm$ 230	4 873 $\pm$ 224	0,01
GRC-Ac	4 990 $\pm$ 1 357	5 994 $\pm$ 1 735	ns

### *Fagocitosis de GRC-Ac*

El exudado peritoneal también se extrajo cuatro días después de suministrado el bagazo. La media de la cantidad de inmunocomplejo resultó menor en los cultivos de ratones instilados con bagazo, aunque la diferencia no fue significativa. No hubo diferencias en el número de células de los exudados peritoneales.

### *Histología*

Las células adheridas al vidrio después de 48 horas de cultivo fueron en un 100% fosfatasa positiva (figura 1). La población celular sobre los cubreobjetos colocados en el fondo de las placas de Petri parecía más escasa en los cultivos procedentes de animales que recibieron bagazo. Sin embargo, las características morfológicas de ambos grupos eran semejantes (figuras 2 y 3). La media del número de células mononucleares con reacción positiva de fosfatasa ácida en los exudados normales, fue superior a la media del número de células positivas en los exudados de los ratones que habían inhalado bagazo. Esta diferencia resultó significativa ( $p > 0,005$ ) (cuadro II).

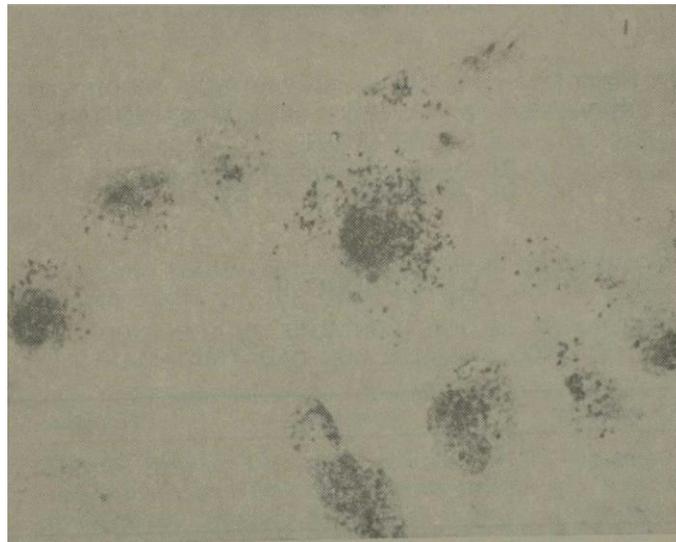


Figura 1

*Reacción de fosfatasa ácida en macrófagos peritoneales cultivados durante 48 horas en placas de Petri. Ampliación original 718 X.*

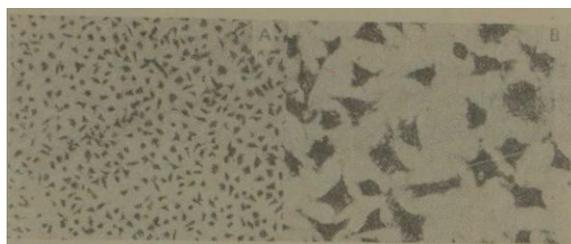


Figura 2

*Microfotografías de un menor y un mayor aumento de cultivos de macrófagos procedentes de ratones tratados con salina. Coloración de May Grünwald Giernsa.*

- A) Ampliación original 140 X.
- B) Ampliación original 560 X.

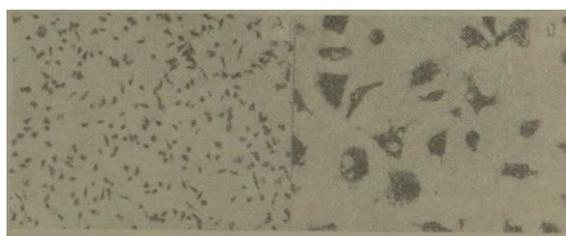


Figura 3

*Microfotografías de cultivos de ratones tratados con bagazo.*

- A) Ampliación original 140 X.
- B) Ampliación original 560 X.

#### CUADRO II

MEDIAS DEL NUMERO DE CELULAS CONTADAS EN LOS EXUDADOS PERITONEALES DE CINCO ANIMALES CON CADA TRATAMIENTO

Tratamiento	Fosfatasa –	Fosfatasa +
Salina	68,6	399,4
Bagazo	123,6	297,4

#### DISCUSION

La disminución en la cantidad de Inmunocomplejo fagocitado en los cultivos de animales que inhalaban polvo de bagazo, puede deberse al menor número de macrófagos adheridos al vidrio, al estar disminuida la cantidad de macrófagos en el exudado sembrado, o puede deberse a alte-

raciones de la capacidad fagocítica de dichas células. Después de lavadas las placas de Petri con salina y a las 48 horas de cultivo sólo quedan sobre las placas los macrófagos, el resto de las células son eliminadas; por lo tanto el número de células adheridas al vidrio debió ser menor en los cultivos del lavado peritoneal de los animales con bagazosis, con igual o menor número de células totales, en relación con los controles. No todos los ratones adquieren la bagazosis con igual gravedad. En algunos, las lesiones pulmonares son moderadas y no se produce inmunodepresión, lo cual puede explicar que las diferencias entre las cantidades de material radiactivo fagocitado no fueran significativas en dos experiencias.

En los pulmones de los animales que han aspirado suspensión de polvo de bagazo, se producen lesiones granulomatosas en las que aparecen células mononucleares y células gigantes.<sup>10,11</sup> Los macrófagos acumulados en las lesiones inflamatorias provienen de los monocitos de la sangre. En ratas infectadas con *Salmonella enteritidis*, la vida media de los monocitos de la sangre se reduce y se disminuye su número al inicio de la infección. *f. Jungy y D. McGregor*<sup>13</sup> encontraron que en la cavidad peritoneal de las ratas inyectadas por esa vía con antígenos de *Listeria monocitogena*, se producían factores responsables de la agrupación de monocitos marcados procedentes de la sangre. La retención de macrófagos se produjo igualmente, al inyectar el antígeno en la oreja del animal. En ratones con esple- nomegalia asociada con el aumento del número de macrófagos, provocada por infección con *Plasmodium berghei* o por la administración intraperitoneal de metil celulosa, se encontró también que se producían localmente sustancias capaces de atraer y retener los monocitos circulantes.<sup>14</sup>

En nuestros ratones enfermos, la disminución de los macrófagos en el exudado peritoneal podría deberse, por tanto, a una disminución del número de monocitos circulantes, ocasionada por la acumulación de estas células en los sitios de inflamación provocados por la bagazosis.

#### *Reconocimientos*

*Agradecemos la eficiente colaboración en la ejecución de las experiencias a las compañeras Isabel Dinamarca, Isabel C. Pérez, Juana Delgado y Amelia Capote.*

#### SUMMARY

Pauste, H. et al. *In vitro phagocytic activity of mice macrophages with bagassosis*. Rev Cub Med 21: 3, 1982.

In macrophage cultures obtained from peritoneal exúdate of mice that had inhaled bagasse dust, a lesser immunocomplex phagocytosis activity, was found when compared with that of animals who only inhaled satine dust. A decreased number of mononuclear cells with positive acid phosphatase reaction within cells extracted from peritoneal cavity was also found, which should explain dlfference on amount of material phagocytied by cells attached to the glass.

#### RÉSUMÉ

Pauste, H. et al. *Activité phagocytaire in vitro de macrophages de souris porteurs de bagassose*. Rev Cub Med 21: 3, 1982.

Dans les cultures de macrophages obtenues a partir de l'exsudat péritonéal de souris qui avaient inhalé de la poudre de bagasse, il a été trouvé une activité inférieure de

phagocytose de complexe immun, par rapport aux animaux qui n'avaient inhalé que de poudre saline. Il a été trouvé aussi une diminution du nombre de cellules mononucléaires avec réaction positive de phosphatase acide dans les cellules prélevées de la cavité péritonéale, ce qui pourrait expliquer la différence en ce qui concerne les quantités de matériel phagocyté par les cellules adhérentes au verre.

## PE3KME

IlaycTe, H. a jip. íarcoaTapHatf aKTaBHocTB in vitroMaKpo<ia TOB Kpuc C tíara30COM. Rev Cub Med 21< 3, 1982.

**B** KyjitTaBax MaKDoiparoB, nojiyqeHHHX a3 ópioniaHHoro SKcyaaTa - Kpuc, kotophm óuji HHrajiapoBaH nopomoK Óara30, ÓHJia oÓHapyTKe- Ha HedojibmaH aKTHBHOCCTI míMyHOKOMruieKCH0r0 !|)aroixHT03a, no - cpaBHQHaio c KO.BOTHHT.ni, kotophm ówísl aHrajmpoBaHa T0JIBKO CaJITI Ha. Kpowte Toro, óhjo oÓHapyxeHo nonaKeHae b kojihscbt? moho- anepHHx mieTOK c nojioKHTejiBHoM peannaen nacjiofi ŠocŠaTa3H r- KJieTKax, b3hthx tipioimHHoñ no'ocTa. Što noHraeHae momo <3h - otiBHCHaTB pa3HHiy b KOJianecTBe cparoiiaTapHoro waTepaa^a kjjüt- Kar.a, npajieramaíra k cTewiy.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Pauste, H.* Depresión de la síntesis de anticuerpos en la bagazosis experimental. Rev Cub Med 18: 101, 1979.
2. *Claman, H. N.; E. A. Chaperon.* Immunologic complementation between thymus and bone marrow cells. A model for two cell theory of immunocompetence. Transplant Rev 1: 92, 1969.
3. *Garczynski, R. M.* Control of immune response: role of macrophage in regulation of antibody and cell-mediated immune response. Scand J Immunol 5: 1031, 1976.
4. *Marc Feldman, P. N. Hogg.* Role of macrophages in the generation of T-helper cell. IV. Nature of genetically related factor derived from macrophages incubated with soluble antigen. Eur J Immunol 6: 365, 1976.
5. *Virelizier, J. L.* Mechanisms of immunodepression induced by viruses: possible role of infected macrophages. Biomedicine 22: 255, 1975.
6. *Finlay, C. J. y otros.* Degradación intracelular de inmunocomplejo fagocitado por macrófagos. Revista CENIC 8: 1, 1977.
7. *Barka, T.; P. J. Anderson.* Histochemistry. P. 239, Hoeber Medical División, London, 1963.
8. *Sidak, Z.; J. Vondráček.* Neparаметrický test rozdílnosti polohy duon populací. Aplikace Matematiky 2: 215, 1957.
9. *Smetana, H. F.; H. G. Tande.* Experimental bagasse disease of the lung. Lab Invest 11: 864, 1962.
10. *Calviño del Río, A.; E. Morales.* Estudio preliminar sobre la bagazosis. Rev Cub Hig 15: 51, 1977.
11. *Moisés, T.; C. Finlay.* Estudio histopatológico y ultraestructural de bagazosis inducida en ratones. Revista CENIC. (En prensa.)