

ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DEL MACRÓFAGO PERITONEAL EN RATAS ENVEJECIDAS.

Damisela Ramírez Ramírez¹, María Caridad García Barceló², Giselle Puldón Seguí³, José Antonio Estrada Ramírez⁴

¹ ICBP "Victoria de Girón". Cuba.

² ICBP "Victoria de Girón". Cuba.

³ ICBP "Victoria de Girón". Cuba.

⁴ Centro Nacional de Genética Médica. Cuba.

Correo electrónico: damisela@giron.sld.cu

RESUMEN

El envejecimiento es un conjunto de cambios deteriorantes postmaduracionales que implican una vulnerabilidad a los retos y una disminución en la habilidad del organismo para sobrevivir. Estos procesos degenerativos, de comienzo temprano y progresión lenta, debilitan severamente a los seres humanos, de modo que algunos mueren antes de alcanzar la esperanza de vida de la población. Numerosos estudios demuestran que no es un proceso de causa única, sino el resultado de una compleja asociación de modificaciones bioquímicas, fisiológicas y psicológicas que aparecen como consecuencia de la acción del tiempo sobre los seres vivos.

Cambios en la actividad funcional de los macrófagos peritoneales son alteraciones que se producen durante la vejez; aunque aún son contradictorios los datos existentes al respecto. Con el objetivo de evaluar la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales realizamos el presente estudio. Para ello empleamos ratas Wistar machos adultos jóvenes (9 a 12 semanas) y adultas viejas (33 a 36 semanas).

No se encontraron cambios significativos en la actividad fagocítica de las ratas envejecidas con respecto a las jóvenes, lo que pudiera estar relacionado con la edad promedio de las ratas envejecidas utilizadas en nuestro estudio.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es uno de los grandes problemas que enfrenta hoy el mundo desde el punto de vista demográfico por su repercusión en todas las esferas de la sociedad.

Para el año 2000 se estimaba que en América Latina y el Caribe la población aumentaría a 42 millones de personas y que para el 2020, el 12,4 % de la población, es decir 82 millones de personas, tendrán más de 60 años¹.

En Cuba la esperanza de vida al nacer según el último reporte de la oficina nacional de estadística es de 76 años. El 14,5 % de la población es mayor de 60 años y la población de 60 a 74 años representa el 69 % de los adultos mayores¹.

Los cambios acumulativos que se producen en el envejecimiento incluyen: muerte celular, mutaciones nucleares oncogénicas, senescencia celular, formación de agregados lisosomales y extracelulares, entrecruzamiento al azar de proteínas extracelulares, cambios endocrinos y decadencia del sistema inmune².

Este sistema protege al organismo contra virus, bacterias y otros microorganismos invasores, lo mismo que contra células propias lesionadas. Consta de dos mecanismos que actúan de manera coordinada: unos **innatos** (monocitos/macrófagos, neutrófilos, mastocitos, linfocitos NK y proteínas del Complemento), con receptores inespecíficos de reconocimiento del antígeno, que no presentan memoria y que actúan en la primera fase de la infección, y los **adaptativos** (linfocitos T y B), inducibles, caracterizados por su especificidad para reconocer los antígenos por selección clonal y por la memoria inmunológica³. Con el envejecimiento se producen alteraciones en estos mecanismos de defensa, que algunos autores denominan "**inmunosenescencia**".

Se han estudiado cómo se modifican las funciones claves de las células inmunitarias, siendo las más representativas los fagocitos y dentro de estos los macrófagos peritoneales en ratones y neutrófilos de sangre periférica en humanos⁴. Los macrófagos fueron descritos por primera vez en el año 1890, por Ellie Metchnikoff y Messina. Se localizan en todos los tejidos del organismo. Constituyen células variables por el papel que juegan en la presentación y procesamiento de los antígenos, en la producción de moléculas con actividad biológica y en el metabolismo de los lípidos.

El término macrófago fue asignado por Aschoff en 1924 al sistema reticulo-endotelial que incluye no solamente monocitos, macrófagos e histiocitos, sino también fibroblastos, células endoteliales y células reticulares^{5,6}.

Inicialmente se consideraban dos clases de macrófagos: libres y fijos y se suponía que ambos tipos de macrófagos tenían un origen y función diferente⁶. Tras la introducción de los métodos de inmunocitoquímica y marcaje isotópico, se

demonstró que los macrófagos libres y fijos, son fases diferentes del ciclo vital de células con origen común. En 1969, se define el concepto de sistema fagocítico mononuclear, como una variedad de macrófagos que tienen su origen en las células germinales pluripotenciales granulo-monocíticas de la médula ósea⁷.

Son producto de la maduración de los monocitos, los cuales circulan en la sangre durante uno o dos días y posteriormente emigran hasta alcanzar el tejido conectivo, en el que finalmente se diferencia en macrófagos, cuyo ciclo vital es de aproximadamente dos meses⁷.

El método más fiable para la identificación de los macrófagos es la detección inmunocitoquímica de sus marcadores específicos de superficie. Su plasmalema contiene aproximadamente 2×10^6 receptores Fc que se unen a las inmunoglobulinas, así como receptores para el complemento tipo 1 (CR1). Posee además receptores para moléculas de superficie del microorganismo tales como oligosacáridos de superficie, lectinas y el receptor para el complemento tipo 3 (CR3)^{6,7}.

Los términos de macrófagos libres y fijos han sido sustituidos por otros de carácter más descriptivo:

- 1- Macrófagos residentes (Presentes normalmente, en ausencia de estímulo exógeno en una zona concreta).
- 2- Macrófagos provocados (Los que son movilizados hacia una zona en respuesta a un estímulo).
- 3- Macrófagos activados (Los que aumentan en gran medida sus capacidades de fagocitosis y de procesamiento de antígeno en respuesta a un estímulo local)⁷.

Los macrófagos residentes, son células fusiformes o estrelladas que están ampliamente distribuidas entre los haces de fibras colágenas, aunque suelen ser más abundantes en la vecindad de los vasos sanguíneos de pequeño calibre; los mismos pueden obtenerse a partir del peritoneo de ratas que no han sido estimuladas inmunológicamente. La facilidad con la que pueden obtenerse estas células, ha hecho que los macrófagos peritoneales de rata sean utilizados en numerosas ocasiones como modelo celular para diversos estudios⁸.

Los macrófagos presentan diferente morfología dependiendo del órgano donde se localicen, así como distinta actividad según su grado de maduración, su activación y su propia localización; y en estados de inflamación crónica se congregan, crecen considerablemente y se tornan células gigantes de cuerpo extraño^{7,8}.

Estas células realizan una gran variedad de funciones en la respuesta inmune y a pesar de no ser específicos para un antígeno determinado, su actividad en la concentración y presentación de los antígenos a los linfocitos es vital en el desencadenamiento de la respuesta contra estos. A esto se añade que los

macrófagos agregan mediadores biológicamente activos, capaces de activar a los linfocitos. Sin embargo su función primordial es la fagocitosis de microorganismos y macromoléculas, a las que reconocen mediante sus receptores endocíticos⁸.

La fagocitosis, mecanismo importante de defensa inespecífica. Esta acción la llevan a cabo diferentes tipos celulares pero principalmente neutrófilos y macrófagos^{6,7,8}.

El término fagocitosis proviene del griego (phagein, comer) y (osis, proceso) y comprende diversas etapas⁸:

1. Quimiotaxis: Donde algunos componentes microbianos, citocinas y los productos del complemento, como C5a, C3a, atraen a los fagocitos.
2. Unión del fagocito al microorganismo. Esta unión puede estar mediada por diferentes sistemas: lectinas, receptor para el C 3 presente en la membrana del fagocito, complemento depositado por las vías alternativa ó clásica (C3b ó C4b) y anticuerpos unidos a microorganismos. Las proteínas del complemento y las inmunoglobulinas al unirse a la superficie de las bacterias las hacen más vulnerables a la fagocitosis a través de un proceso que se llama opsonización. Cuando la bacteria opsonizada se une a la superficie de los macrófagos, se inicia su ingestión mediante un mecanismo de tipo cremallera en el que los receptores Fc y C3 de su plasmalema se unen a los ligadores correspondientes situados en la superficie de las bacterias, hasta que esta última es englobada completamente por las prolongaciones y pliegues de la superficie del macrófago⁸.
3. Ingestión, formándose un fagosoma y posteriormente el fagolisosoma. Tras la fusión de las membranas en el borde anterior de las prolongaciones celulares que engloban a la bacteria, esta queda incluida en una vacuola (fagosoma) que se introduce en el citoplasma. Los lisosomas se fusionan con el fagosoma dando origen al fagolisosoma.
4. Una vez interiorizado, los microorganismos están expuestos a una serie de mecanismos destructivos.

A pesar del importante papel que juega el macrófago en el desarrollo de la respuesta inmunológica, son escasos y contradictorios los trabajos publicados acerca de cómo varían sus actividades funcionales durante el proceso de envejecimiento, por lo que nos proponemos describir la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales durante este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrolló un trabajo básico experimental, sobre la base de un estudio prospectivo y descriptivo, utilizando la rata Wistar macho adulta joven y adulta vieja como modelo biológico, las mismas provenientes del Centro Nacional de

Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los experimentos se efectuaron en el Departamento de Cirugía Experimental y en el Bioterio y **laboratorio de Histología del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"**.

Se seleccionaron un total de 40 ratas, con un peso aproximado entre 200 y 250 gramos, para conformar dos grupos con 20 ratas adultas jóvenes (edad promedio de 9 a 12 semanas) y 20 ratas adultas viejas (edad promedio de 33 a 36 semanas). Las mismas fueron colocadas en jaulas individuales, se alimentaron con dieta ratonina y se les administró agua ad libitum.

Todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico 40 mg/kg de peso y se les realizó una incisión de aproximadamente 3 cm a nivel de la línea alba abdominal, previa de asepsia y antisepsia de la zona, se abrió la cavidad peritoneal utilizando dos pinzas de disección con dientes y se introdujeron dos cubreobjetos en la misma, uno a cada lado. Terminado este proceder se cerró la herida quirúrgica con puntos Michel y se colocaron en jaulas individuales.

Se conformaron 5 subgrupos de cada grupo, a los que se les extrajo los cubreobjetos a las 24 horas, 3, 5, 7 y 10 días, respectivamente. Los animales quedaron al cuidado de un personal técnico e investigativo con la calificación suficiente para proporcionarles el cuidado adecuado y de esta forma prevenir la sepsis o evitar la muerte de los mismos.

Pasadas las primeras 24 horas se procedió a anestésiar a las ratas del primer subgrupo, con una mezcla de éter y cloroformo previamente preparada y fueron colocadas en una campana de vidrio hasta quedar dormidas; luego se retiraron los puntos de seguridad con ayuda de una pinza Kocher y una vez abierta la cavidad abdominal se extrajeron los cubreobjetos y se utilizaron las caras externas de los mismos para el procesamiento. Este mismo proceder se realizó con el resto de los subgrupos en los tiempos establecidos. Fueron excluidos del estudio las ratas que murieron, presentaron dehiscencia de la sutura o sepsis de la herida.

Para el estudio histológico se realizó la técnica de fagocitosis⁹: Los cubreobjetos fueron colocados en una placa de petri, añadiéndole el medio de cultivo RPMI¹⁰ hasta que fueron cubiertos por el mismo, se le añadió 2 gotas de azul de tripano con una dilución de 1/500 y dejándolo incubar durante un período de 15-30 minutos dentro de una incubadora a 37 grados de temperatura. Pasado este tiempo, fueron extraídos y procesados, pasando las muestras por un proceso de deshidratación con alcoholes de gradación creciente (alcohol 95% y dos pasos por alcohol absoluto y luego fueron aclaradas con xilol). Por último se le añadió bálsamo de Canadá y se colocó encima de un portaobjeto para su posterior observación al microscopio.

Las láminas fueron observadas en un microscopio óptico CETI con objetivos de 10x, 40x y 100x, siendo evaluados los siguientes parámetros histológicos: Tipos celulares y cantidad de colorante fagocitado.

☞ **Tipos celulares**

Para determinar el número de células monocíticas, macrófagos y otros tipos celulares (fibroblastos, neutrófilos y adipocitos) presentes en las láminas estudiadas, se contaron e identificaron en cada una, las primeras 100 células.

☞ **Cantidad de colorante fagocitado**

La cantidad de colorante fagocitado se determinó mediante la identificación de 20 macrófagos por lámina y del número de vacuolas digestivas presentes en cada uno de ellos, teniendo en cuenta la siguiente escala:

- a. No hay colorante fagocitado (x).
- b. Una vacuola con escaso colorante fagocitado (xx).
- c. Dos vacuolas con colorante ó una vacuola con abundante colorante fagocitado (xxx).

Se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel y todas las determinaciones se realizaron con el procesador SPSS 11.0 sobre Windows.

Se calcularon medias aritméticas y desviaciones estándar a todas las variables bajo estudio. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para ver el comportamiento de los diferentes grupos. Se consideró que existían diferencias significativas cuando el valor de p fue menor que 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al describir la actividad fagocítica en los diferentes subgrupos de ratas jóvenes y envejecidas observamos que la cantidad de monocitos, macrófagos y otros tipos celulares fue similar [Tabla # 1] por lo que no se encontraron diferencias significativas entre los mismos ($p > 0.05$).

En los macrófagos analizados, la cantidad de vacuolas digestivas observadas que predominó, fue de 1 a 2 en los subgrupos de 5 y 10 días [Tabla # 2], aunque al comparar todos los resultados obtenidos, entre las ratas jóvenes y envejecidas no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Tampoco se observaron cambios histológicos evidentes (Figuras 1 y 2).

Cuando ocurre una lesión tisular, los macrófagos presentes en los tejidos se convierten en unidades móviles, formando la primera línea de defensa alrededor de la primera hora, sin embargo, su número no suele ser muy considerable; por lo que también penetran en el tejido los neutrófilos y los monocitos de la sangre; aunque el número de monocitos circulantes es bajo, así como la proporción de los almacenados en la médula ósea. La acumulación de estas células es un proceso que

requiere varios días para que se haga efectiva; incluso después de haber invadido el tejido inflamado, los monocitos son aún células inmaduras y requieren 8 horas o más para alcanzar tamaños mayores. Sin embargo, al cabo de días (24 a 48 horas) o semanas, los macrófagos predominan sobre las demás células del área inflamada, debido a que se produce una disminución de la producción de factores estimuladores de colonias monocíticas, granulocíticas y granulo-monocítica por parte de los macrófagos¹¹.

Los resultados encontrados en nuestro estudio relacionados con las variaciones de los tipos celulares en el tiempo, se comportaron similares a lo referido anteriormente, ya que se encontró una disminución gradual del número de células monocíticas con el tiempo y una estabilización en la cantidad de macrófagos peritoneales a partir del 5to día de exposición del cubreobjetos en la cavidad abdominal.

En la actualidad se reconoce que durante el proceso de envejecimiento ocurren cambios en el sistema inmune que afectan su funcionamiento y desarrollo. Estos cambios pueden ocurrir tanto a nivel de la inmunidad innata como en la adaptativa o en sus diferentes momentos; desde la linfopoyesis hasta la respuesta final del sistema inmune frente a determinada enfermedad^{12,13}.

Según la literatura revisada el sistema inmune innato, protagonizado por los monocitos/macrófagos, neutrófilos, mastocitos, linfocitos Natural Killer (NK), parece estar afectado moderadamente. A pesar del importante papel que juega el macrófago en el desarrollo de una respuesta inmunológica, son muy pocos los trabajos publicados acerca de cómo varían sus actividades funcionales durante el proceso de envejecimiento. Además, los pocos datos encontrados son contradictorios. No obstante, existen evidencias que demuestran una reducción del potencial funcional en los monocitos y macrófagos de ratones envejecidos^{14,15}.

Se plantea que la actividad disfuncional de los macrófagos asociados con la edad se debe a: disminución en la producción de citocinas y factores de crecimiento, disminución en el estallido respiratorio de células fagocíticas, defectos en la presentación de antígenos polisacáridicos e incremento en la producción de prostaglandina E-2^{16,17}.

En nuestro trabajo con relación a la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales estudiados, se encontró que la formación de 1 o 2 vacuolas con colorante fagocitado fue la que predominó, lo que pudiera deberse a la concentración del colorante empleado y al tiempo de exposición de las células al mismo, parámetros establecidos en nuestro estudio, que permitieron realizar el conteo de las vacuolas; sin embargo al comparar todos los resultados obtenidos, no se encontraron diferencias significativas entre ratas jóvenes y envejecidas.

Nuestros resultados podrían estar relacionados además con aspectos del diseño experimental, tales como la poca cantidad de animales por grupo o por no utilizarse ratas de mayor edad, lo que no permitió evidenciar cambios apreciables en el comportamiento de este indicador entre los grupos estudiados.

Es importante señalar que la mayoría de los estudios indican que la inmunidad adaptativa, desarrollada por los linfocitos T y B, es la más afectada en el proceso de envejecimiento¹⁷ y el nuestro se basa en el análisis de la función fagocítica del macrófago; principal mecanismo a través del cual el sistema inmune elimina la mayoría de los microorganismos patogénicos extracelulares.

Para asegurar una respuesta inmune óptima es necesaria la cooperación de varios niveles existentes entre ambos sistemas (inmunidad innata y adaptativa). Por tanto, cualquier alteración en uno de los sistemas puede tener un impacto en la función del otro ya que podría provocar una activación indebida de uno de ellos^{16,17}.

CONCLUSIONES

La actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales se comportó de manera similar entre las ratas jóvenes y envejecidas, dado por su incremento gradual y la estabilización posterior, como por su poder fagocítico, lo que pudo deberse a aspectos relacionados con el diseño experimental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Puig JM, Adell MC, Prat A, Oromí J. El envejecimiento poblacional como problema sanitario. *Medicina Integral* 2000; 36 (5): 190.
2. Campos R, Barzuna L. Estudio del Envejecimiento. *Rev Méd. Hosp. Nac. Niños* 2004; 39 (2): 7.
3. Rojas W, Anaya JC, Aristizabal B, Cano L, Gómez L, Lopera D. *Inmunología; Compendio de la 15^o Edición de Inmunología de Rojas*. Primera. Medellín: CIB; 2010.
4. Mohan H. *Patología*. Sexta Edición. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2010.
5. Fortoul T, Castell A. *Histología y Biología Celular*. Primera edición, : España: Editorial McGraw-Hill; 2010
6. Finn G. *Métodos histológicos. Histología sobre bases biomoleculares*. 3^a ed. España: Panamericana SA; 2000. p. 19 - 47.
7. Ross, M. Pawlina W. *Histología: Texto y atlas color con Biología celular y molecular*. Sexta edición, Madrid, España: Editorial Medica Panamericana; 2012
8. Sierra Filardi E, Corbí López AL. *Marcadores de activación alternativa de macrófagos DC-SIGN y FRβ*. **Universidad Complutense de Madrid; 2010: [Tesis]**.

9. Karnousky ML, Metchinkoff in Messina: a century of studies on phagocytosis. N Engl J Med 1981; 304: 1178- 80.
10. Georgiev I. Uersahren für die supravitale Untersuchung der Bent - und Bindegewebszellen bei aseplischer Entzündug Comp. R. de La Acad. Bulg. Sc. 1960; 13 - 111.
11. Xu J, Shi G. Emerging Role of Mast Cells and Macrophages in Cardiovascular and Metabolic Diseases; 2012.
12. De la fuente M. La nutrición y el sistema inmunitario en el envejecimiento. Rev Es Geriatr Gerontol 2002; 37: 17 - 25.
13. Rubin R , Strayer D, Rubin E. Patología. Sexta edición. Barcelona, España: Wolters Kluwer Lippincott Williams Wilkins; 2012.
14. Guayerbas N, De la Fuente M (2003) An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. Dev. Comp. Immunol. 27, 339 - 350.
15. Ovalle SI, Gorocica RP, Lascurain LR, Galindo ZE. Aspectos inmunológicos del envejecimiento. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2004; 17(4):293-300.
16. De la fuente M Las defensas contra la infección, inmunidad y envejecimiento. En: Barja G ed. El problema del envejecimiento. Madrid: Akal; 1998. p. 61 - 89.
17. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Patología estructural y funcional Robbins y Cotran. Octava edición. Barcelona, España: Elsevier Saunders; 2010.

ANEXOS

Tabla #1: *Variaciones de los tipos celulares en el tiempo, en ratas jóvenes y envejecidas.*

	1er D J / V	3er D J / V	5to D J / V	7mo D J / V	10mo D J / V
Células monocíticas	50 / 55	35 / 38	10 / 10	13 / 11	0 / 0
Macrófagos	30 / 30	65 / 62	78 / 72	77 / 79	90 / 75
Otros tipos celula-res	20 / 15	10 / 10	12 / 18	10 / 9	10 / 25

Tabla #2: Actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales en ratas jóvenes y envejecidas.

	1er Día		5to Día		10mo Día	
	Rata joven	Rata vieja	Rata joven	Rata vieja	Rata joven	Rata vieja
No hay colorante.	66	62	13	15	8	9
1 ó 2 vacuolas con poco colorante.	34	38	55	51	53	54
Más de 2 vacuolas o 1 vacuola gran-de con abundante colorante.	0	0	32	34	35	32

Figura #1: A: Actividad fagocítica de macrófagos peritoneales en una rata joven del subgrupo de 5 días. (Técnica de fagocitosis, 1000X). B: Nótese la presencia de proyecciones citoplasmáticas y vacuolas con abundante colorante, en el citoplasma de los macrófagos peritoneales. (Técnica de fagocitosis, 1200X)

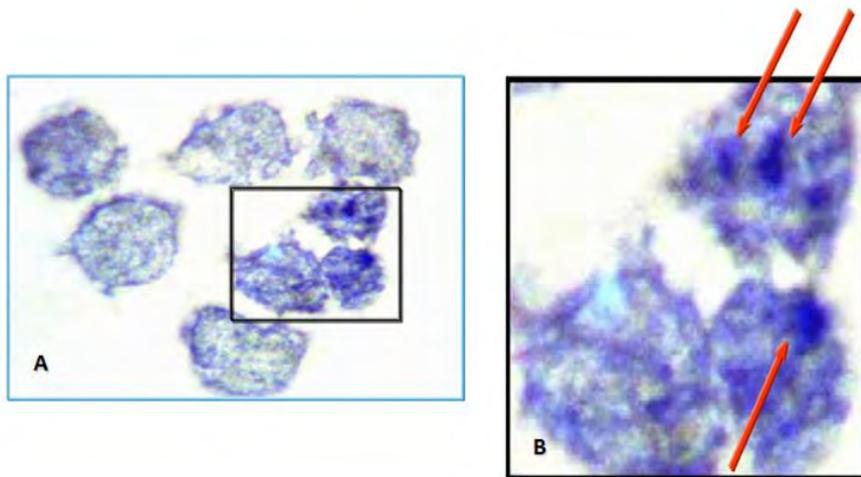


Figura #2: Actividad fagocítica de macrófagos peritoneales en una rata envejecida del subgrupo de 5 días. (Técnica de fagocitosis, 1000X).

