

## Localización y contenido de polisacáridos en células de la inflamación aséptica al microscopio electrónico

O. ANCHETA Y J. KOURÍ

*Laboratorio de Microscopía Electrónica, C.N.I.C. de Cuba*

*Recibido en: Abril 1972*

**ABSTRACT.** An electron microscopic study was made to determine the location and content of polysaccharides in the cells of an aseptic inflammation produced in the peritoneal cavity of rats by implantation of epon laminae.

The material was processed for electron microscopy for demonstrating sites of polysaccharide reaction products at the electron microscope level. The TSH-Silver proteinante technique was applied on thin sections.

Variations in polysaccharide content observed in the different cell types of the aseptic inflammation underwent modifications during the successive days of the experiment.

Variations in the polysaccharide content observed in the different cell types, with special references macrophages and cells intermediate between macrophages and fibroblasts are discussed in relation to the possible transformation of macrophages into fibroblasts.

**RESUMEN.** Se estudió el contenido y la localización de polisacáridos en células de una inflamación aséptica de la cavidad peritoneal de las ratas, la cual fue provocada por la implantación de láminas de epon 812.

El material obtenido fue procesado para Microscopía Electrónica. Sobre los cortes ultrafinos se realizó la técnica TSH — proteinato de plata para revelar polisacáridos.

Se observan variaciones en el contenido de polisacáridos de los diferentes tipos celulares presentes en la inflamación, variaciones que se modificaban en el transcurso de los días del experimento.

Se discuten las variaciones y la localización del contenido de polisacáridos observadas en los distintos tipos celulares de la inflamación aséptica en particular de los macrófagos, células intermedias entre macrófago-fibroblastos y fibroblastos y su relación con la posible transformación de macrófagos hacia fibroblastos.

### INTRODUCCION

La presencia de polisacáridos ha sido estudiada por métodos bioquímicos (*Bazin y cols., 1953*) y citoquímicos (*Georgiev y cols., 1966; Fox, 1970; Walchstein, 1949; y Robert y col., 1949*) al microscopio óptico en células de la inflamación tanto séptica como aséptica, en células sanguíneas normales, en células leucémicas y médula ósea. Con los métodos citoquímicos se ha analizado el contenido de este polímero

en los distintos tipos celulares y su posible significado funcional. Se ha planteado que la presencia de polisacáridos en macrófagos (*Georgiev y cols., 1966*) es un índice de su grado de diferenciación y que la cantidad está relacionada con su actividad funcional, como por ejemplo sirviendo de material energético para la fagocitosis (*Bazin y cols., 1953*).

El propósito de nuestro trabajo es la localización de los polisacáridos en los distintos tipos celulares y las variaciones en el contenido de estos polisacáridos que se observan en cada uno de los días de un proceso inflamatorio agudo, empleando técnicas citológicas en microscopía electrónica.

### MATERIAL Y METODO

Se emplearon 14 ratas de ambos sexos del tipo Wistar cuyo peso era de 150-200 grs, a las cuales se les implantó en la cavidad peritoneal 4 láminas de Epon 812 las que se extrajeron a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 10 días; se completaron 2 series de experimentos.

Las láminas así obtenidas fueron procesadas para microscopía electrónica (*Kouri y cols., 1970*). Los bloques fueron cortados en el Ultramicrotomo LKB Ultratome III. Sobre los cortes de color plateado a amarillo claro se realizó la técnica TSH - proteínato de plata (*Thiery, 1967*) para revelar los polisacáridos. Los cortes fueron finalmente montados sobre rejillas de 400 mesh sin membrana soporte. Para control se fijaron láminas en glutaraldehído al 2% por 4 horas. Se realizó la técnica de Thiery sin el pasaje de los cortes por ácido periódico y pasándolos por saliva humana de 1 a 4 horas. No se realizó post-contraste a las muestras, las cuales fueron observadas en el microscopio electrónico Hitachi HS-7.

### RESULTADOS

Se usará indistintamente la denominación de producto de reacción, polisacáridos y la reacción.

El producto de reacción se observó en varios de los diferentes tipos celulares que aparecen en una inflamación aguda: polimorfonucleares (eosinófilos y neutrófilos), células cebadas, monocitos, formas intermedias entre monocito y macrófago, macrófagos, formas intermedias entre macrófagos y fibroblastos y fibroblastos (Tabla I). Estos polisacáridos se encuentran en forma dispersa en acúmulos formados por rosetas y por partículas más pequeñas aisladas coincidiendo con la descripción de otros autores (*Revel, 1964*).

TABLA I

	1er	2do	3ro	4to	5to	6to	10mo
Neutrófilos	xxx						
Eosinófilos	xxx	xxx	x				x
Monocitos	-						
Cebadas	-	-					
Macrófagos	x	xx	xxx	x	x	-	-
Formas intermedias entre Monocitos y Macrófagos		x	xx	xxx		x	
Fibroblastos			xxx	xxx		xxx	xx
Formas intermedias entre Macrófagos y Fibroblastos			x				

- no reacción

x escasa

xx poco abundante

xxx abundante

A las 24 horas de implantación los polimorfos nucleares neutrófilos (Fig. 1) y eosinófilos presentaron abundante producto de reacción en forma dispersa en el citoplasma, mientras que no se observaron en los monocitos (Fig. 2) ni en las células cebadas. Por otra parte, sólo algunos macrófagos (Fig. 3) presentaron la reacción en forma dispersa y escasa.

Al segundo día los eosinófilos presentaron abundantes polisacáridos en forma dispersa en el citoplasma. Las células cebadas no mostraron producto de reacción. En un número mayor de macrófagos (Fig. 4) se observó una reacción más abundante y en forma dispersa por el citoplasma, mientras que algunas de estas células no lo presentaron. En las formas intermedias entre macrófagos y fibroblastos se observó escasos polisacáridos dispersos por el citoplasma. En las muestras del 3er día de implantación observamos escaso producto de reacción en los eosinófilos y en las formas intermedias entre monocitos y macrófagos. Algunos macrófagos presentaron abundantes polisacáridos, unas veces en acúmulos y otras escasos y en forma dispersa por el citoplasma. En las formas intermedias entre macrófagos y fibroblastos

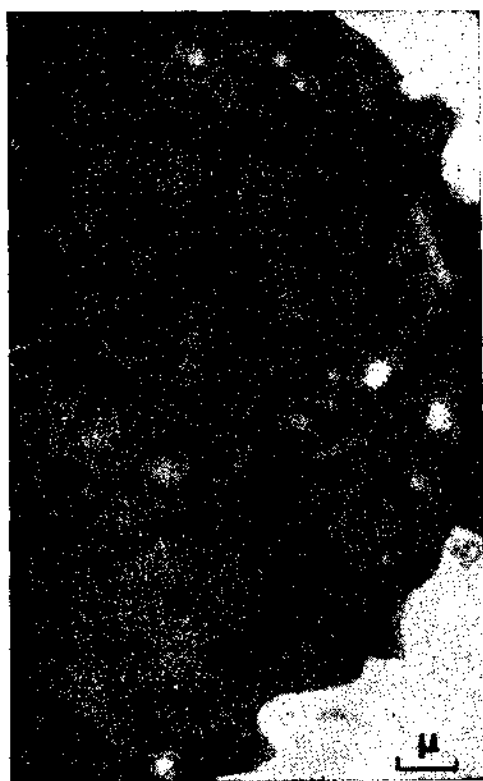


FIG. 1. Neutrófilo. Se observan sus núcleos (N) y su citoplasma cargado de partículas densas (flecha). 12 500 x

FIG. 2. Monocito. No se observa producto de reacción. 10 000 x

se encontraron escasos acúmulos de polisacúridos y en algunas células estaban dispersos. En los fibroblastos la reacción fue abundante, ya sea en forma dispersa o formando acúmulos.

A los 4 días de implantación, los macrófagos (Fig. 5) presentaron escaso producto de reacción en forma dispersa, mientras que las formas intrmedias entre macrófagos y fibroblastos (Fig. 6) lo mostraron en forma dispersa o en acúmulos y en otras células era muy escaso. Asimismo, en los fibroblastos (Fig. 7) observamos la reacción en forma de acúmulos y en otros era muy escaso y disperso por el citoplasma.

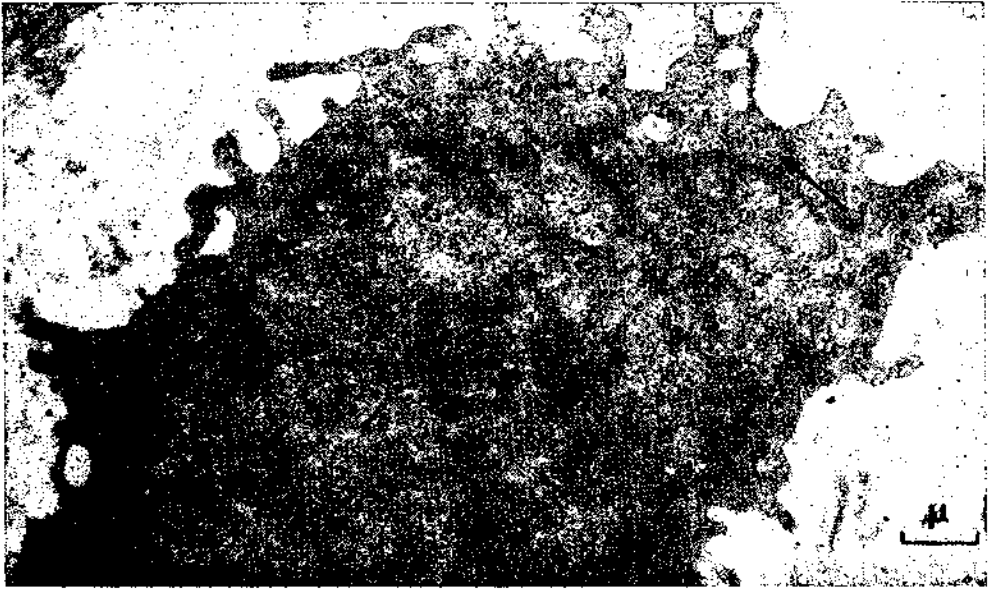


FIG. 3. Macrófago. Presenta el producto de reacción en forma de partículas densas en el citoplasma (flecha). 10 000 x

De la observación de las células del 5<sup>to</sup> día, algunos macrófagos mostraron reacción dispersa, las formas intermedias entre macrófagos fibroblastos presentaron escaso producto de reacción dispersa y en algunas en forma de acúmulos.

Los macrófagos y algunos fibroblastos del 6<sup>to</sup> día se observaron sin reacción, pero algunos fibroblastos presentaron el producto de reacción en forma dispersa y en acúmulos.

En el 10<sup>mo</sup> día los polisacáridos se observaron: en los eosinófilos, escasos y en forma dispersa en el citoplasma; en algunos macrófagos (Fig. 8) no se observaron y en otros se presentaron muy escasos y en forma dispersa; en los fibroblastos (Fig. 9) se encontraron en forma de acúmulos y en forma dispersa en el citoplasma.

En todas las células estudiadas en las cuales existía producto de reacción ya fuera en forma dispersa o en acúmulos, la reacción se observó al parecer en la matriz citoplasmática y nunca en el interior ni del retículo endoplásmico liso, ni en el interior

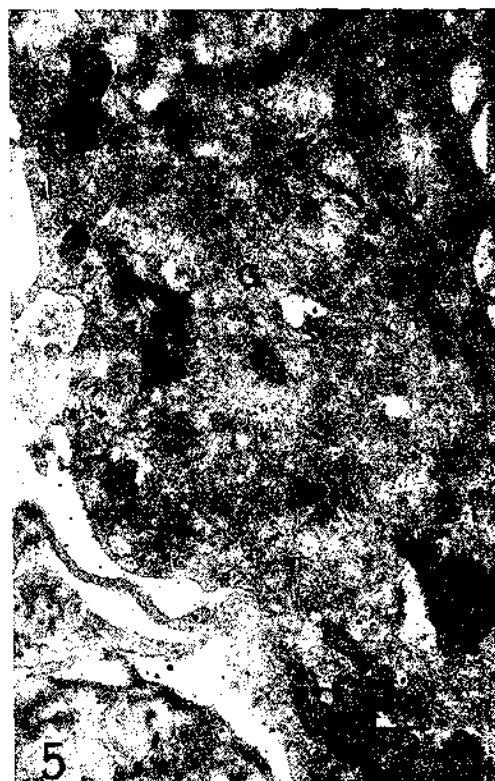
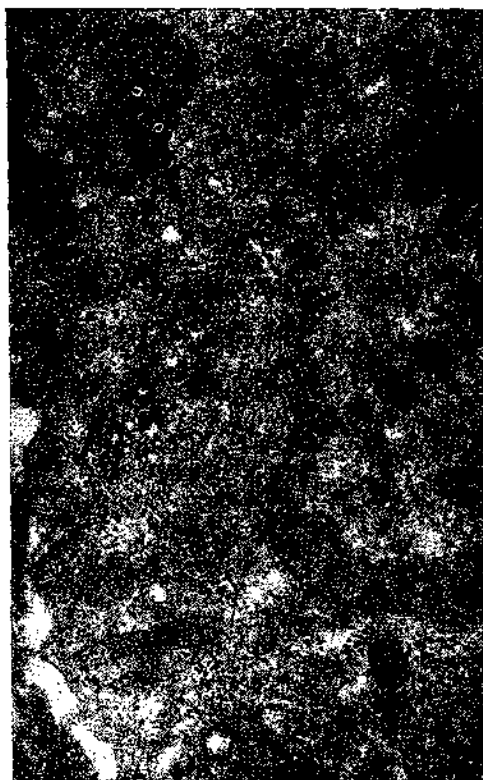


FIG. 4. Macrófago. Aumento del producto de reacción (flecha). La zona del Golgi (G) se observa libre de reacción. 12 500 x

FIG. 5. Macrófago. Escaso producto de reacción en forma dispersa (flecha). En la zona del Golgi (G) no se observa producto de reacción. 10 000 x

de las vesículas del aparato de Golgi, cuando los polisacáridos se encontraron en forma de acúmulos, no se observó que fueran rodeados por ninguna membrana.

*Controles:* Cuando se fijó con glutaraldehído no se observó producto de reacción en ningún tipo celular. En las preparaciones las cuales no fueron sometidas a ácido periódico tampoco se observó la reacción y las células presentaron un fino precipitado de plata sobre la membrana plasmática. Al someter los cortes a la acción de la amilasa salival todas las células observadas mostraron producto de reacción en mayor o menor grado.



Fig. 6. Forma Intermedia entre macrófago y fibroblasto. El producto de reacción se observa en forma de acúmulo (flecha) (RER) 12 500 x

## DISCUSION

Los resultados obtenidos concuerdan con los expuestos por diferentes autores en microscopía óptica (*Walchstein, 1949 y Fox, 1970*). Esto es en lo que se refiere a la ausencia de producto de reacción en los monocitos, precursores de los macrófagos y al gran número relativo de polimorfos nucleares, con abundante reacción y también a la presencia de células cebadas. Este hecho así como la presencia de escaso producto de reacción en las formas intermedias entre monocitos y macrófagos y la escasa reacción en los macrófagos del primer día, apoya la tesis de transformación de monocitos a macrófagos (*Chapman y cols., 1967*).

El aumento del producto de reacción en los macrófagos del segundo y tercer día donde ya es abundante, está de acuerdo con Fox, 1970 quien plantea que estas células han eliminado por fagocitosis los polimorfos degenerados los cuales contenían gran cantidad de glucógeno, siendo éste el responsable de la reacción positiva. A partir del cuarto día los macrófagos presentan muy escaso producto de reacción y en ocasiones ninguno, sin embargo, las formas intermedias (*Kouri y Ancheta, 1971*,



FIG. 7. Fibroblasto. Se observa producto de reacción en forma de acúmulo (flechas). 12 500 x

FIG. 8. Macrófago. No se observa producto de reacción. 10 000 x

1972) entre macrófagos y fibroblastos van mostrando un aumento del producto de reacción, el cual es muy abundante en los fibroblastos, esto sería otro dato que apoyaría el planteamiento de la transformación de macrófagos a fibroblastos. El hecho de que en no todos los macrófagos haya producto de reacción hace pensar en varias posibilidades: no todos los macrófagos se transforman en fibroblastos y de hecho en los resultados de los estudios en cámara de difusión (Kouri, 1971) se observan macrófagos en los séptimo y décimo días. Otra posibilidad es que los polisacáridos se sitúen en lugares específicos de la célula y que el corte no los haya interceptado, ya que cuando se estudia una célula completa al microscopio óptico (Fox, 1970)





FIG. 9. Fibroblasto. Muestra la reacción en forma de acúmulos. (flecha). 12 500 x

se observa que el escaso producto de reacción está localizado hacia la zona de la escotadura nuclear. La otra posibilidad es que la capacidad de síntesis de los polisacáridos se va desarrollando por diferenciación hasta alcanzar su máximo en los fibroblastos, esto nos lo sugiere el hecho de que en las formas intermedias entre macrófagos y fibroblastos se observa un aumento del producto de reacción.

Otro aspecto interesante es el hecho de que en nuestros resultados nunca observamos el producto de reacción en los componentes del aparato de Golgi ni en las vesículas del retículo endoplásmico liso ya que por otra parte este organito es muy escaso en los tipos celulares estudiados; estos resultados no están de acuerdo con lo planteado por Coimbra y col., (1966), quienes plantean que las vesículas de superficie lisa del retículo endoplásmico juegan un papel importante en la síntesis de glucógeno. Hay que tener en cuenta que se parte de material de trabajo distinto, así como el método empleado, autorradiografía, usando glucosa  $H^3$ . Si bien se sabe que este metabolito difunde fácilmente por el citoplasma celular pudiendo dar una falsa localización, también es necesario tener en consideración que en las células de la inflamación aséptica se observa muy escaso el retículo endoplásmico liso.

Para complementar los resultados obtenidos en esta investigación será necesario hacer estudios bioquímicos para medir el contenido de las enzimas que intervienen en la síntesis de polisacáridos en estas células y determinar su localización.

## RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a las compañeras María Elena Ramos, María Cristina de la Rosa y los compañeros Antonio Pazos, Alfredo Alfonso y Jorge Agüero por su ayuda técnica.

## REFERENCIAS

- BAZIN S. DELANNEY A. and CLAUDE A. Le glycogene intraleucocytaire et ses variations au coins de la phagocytose. *Annales de L'Institut Pasteur*, 85, 774, 1953.
- CHAPMAN J. A., GOUGH J. and ELVES M. V. An electron microscope study of the in vitro transformation of human leucocytes. II. Transformation to macrophages. *J. Cell Biol.* 2, 371, 1967.
- COIMBRA A. and LEBLOND C. P. Sites of glycogen synthesis in rat liver cells as shown by electron microscope radioautography after administration of glucose H<sup>3</sup>. *J. Cell Biol.*, 30, 151, 1966.
- FOX M. O. Tesis de doctorado, Centro Nacional de Invest. Cient. de Cuba, 1970.
- GEORGIEV I., TGHIFTOHISKY S., BATCHVAROVA M. et NEDYALKOV I. Sur la cytochimie de L'inflammation aseptique experimentale notamment en relation avec les lipides. V Symposium Histologicum internationales. Editions de L'académie Bulgare des Sciences. Sofia, 1966.
- KOURÍ J., STOYANOV I., VALENTI J. y ANCHETA O. Método para el estudio en microscopía electrónica de macrófagos peritoneales en capa unicelular. *Rev. Cenic* 2, 111, 1970.
- KOURÍ J. y ANCHETA O. Transformation of macrophages into fibroblasts. *Exptl. Cell. Res.*, 71, 168, 1972.
- KOURÍ J. y ANCHETA O. Transformación de macrófagos en fibroblastos. Libro Resúmenes I SIC. Habana, 1971.
- KOURÍ J. Comunicación personal, 1971.
- REVEL J. P. Electron Microscopy of Glycogen. *J. Histochem. and Cytochem.*, 12, 104, 1964.
- ROBERT P. G. and ROBERT E. S. Glycogen in human blood cells. *Blood*, 4, 569, 1949.
- THIERY J. P. Mise en evidence des polysaccharides en microscopie electronique. *J. Microsc.*, 6, 987, 1967.
- WALCHSTEIN M. The distribution of histochemically demonstrable glycogen in human blood and bone marrow cells. *Blood*, 4, 54, 1949.