

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES DESPUÉS DE LA INHALACIÓN A PARTÍCULAS FINAS

Carlos Iván, Falcón-Rodríguez¹, Larisa Idania, García Alonso², Patricia, Segura Medina³.

¹ M en C, Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM. Departamento de Investigación en hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER. Ciudad de México, México.

² Pas. en Biol. Facultad de Ciencias, UNAM. Departamento de Investigación en hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER. Ciudad de México, México.

³ Dra. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER. Ciudad de México, México.

cirf84@hotmail.com

Resumen

Introducción: El pulmón de los mamíferos es el sitio principal de entrada de todos los elementos tóxicos, los cuales son fagocitados inmediatamente por el macrófago alveolar, cuando son partículas pequeñas y solubles. Estas partículas pueden observarse en el interior del macrófago como agrupaciones de varios gránulos redondo oscuros de varios tamaños.

Objetivo: Evaluamos los cambios morfológicos de los macrófagos alveolares de lavados bronco-alveolares de cobayos que inhalaron partículas finas concentradas, como una vía de exposición similar a humanos.

Materiales y Métodos: Utilizamos 10 cobayos, (350-400g), los cuales inhalaron aire filtrado o partículas finas durante 4 h por día (3 días/semana), durante 3 semanas. Al termino de este tiempo, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p). Se realizaron los Lavados bronco-alveolares. Se elaboró el botón celular y se tiñó con Giemsa.

Resultados: Los macrófagos alveolares incrementaron el porcentaje de células y solo algunos presentaron en su interior inclusiones de partículas finas.

Conclusión: El macrófago pulmonar es una célula importante ya que mantiene un equilibrio inmunológico dentro del pulmón, fagocita elementos extraños, especialmente partículas contaminantes. Además, nuestro modelo de inhalación simula realmente la exposición similar a humanos.

Palabras Clave: Macrófagos alveolares; Partículas; Fagocitosis.

Introducción

El pulmón de los mamíferos es el sitio principal de entrada de gran cantidad de elementos tóxicos. Muchos contaminantes son depositados en los bronquiolos o alveolos pulmonares, principalmente algunos sólidos o líquidos tienden a precipitarse por diferentes eventos como impactación, sedimentación, intercepción, y deposición electrostática (Mossman et al., 2011). Para limpiar todos estos elementos, el pulmón cuenta con un sistema físico y químico. El mecanismo físico es conocido como mecanismo de limpieza mucociliar (Pérez et al., 2014), el cual está formado por las células epiteliales ciliadas, las células productoras de moco o caliciformes y las glándulas submucosas. Por otra parte, el mecanismo químico está presente en una serie de células que son capaces de metabolizar estos elementos y se encuentran en 6 tipos celulares como son: la célula bronquiolar no ciliada y ciliada (Katavolos et al., 2009), los neumocitos de tipo I y II (Castell et al., 2005), el endotelio (Castell et al., 2005) y el macrófago alveolar (Pavek and Dvorak 2008). Esta última célula es de gran interés, ya que producen una gran variedad de agentes pro-inflamatorios y anti-

inflamatorios, los cuales incluyen el ácido araquidónico, metabolitos de la ciclooxigenasa y la vía de la lipoxigenasa, además de citocinas, las cuales modulan la función de los linfocitos y promueven la migración y replicación de los fibroblastos (Fels and Cohn 1986).

El macrófago alveolar, desempeñan un papel central en la respuesta inmune innata en las vías aéreas bajas. Poseen receptores de membrana que ayudan a discriminar lo propio de lo no propio. Esta adaptación le confiere al macrófago el aumento en la fagocitosis de cuerpos extraños que están marcados con anticuerpos (Adelman et al., 2005). Sin embargo, algunas partículas pequeñas y solubles pueden ser endocitadas por el propio macrófago, sin necesidad de ser reconocidas por sus receptores membranales (Soukup and Becker 2001). Se ha reportado que la exposición a partículas gruesas ($\leq 10\mu\text{m}$) y finas ($\leq 2.5\mu\text{m}$), reducen el proceso de fagocitosis del macrófago en un 50%, pero las partículas ultrafinas ($\leq 0.1\mu\text{m}$) no modifican esta actividad (Becker et al., 2003). Estas partículas se pueden observar en el interior del macrófago y se distinguen morfológicamente como agrupaciones de varios gránulos redondo oscuros (negro, café, y azul) de varios tamaños (Gottipolu et al., 2009). Sin embargo, esto es posible cuando las partículas ultrafinas aglomeradas son administradas por la vía intra-traqueal o cuando se inhalan altas concentraciones de partículas (Takenaka et al., 2001).

Objetivos

Por lo anterior, evaluamos los cambios morfológicos de los macrófagos alveolares de lavados bronco-alveolares de cobayos que inhalaron partículas finas concentradas, como una vía de exposición similar a humanos.

Materiales y métodos

Para este estudio, se utilizaron 10 cobayos (*Cavia porcellus*) machos cuyo peso oscilaba los 350-400g. Los animales estuvieron expuestos a partículas o aire filtrado en un

concentrador de partículas ubicado en Cinvestav-Zacatenco. Cinco animales inhalaban partículas de 8:00-12:00 h. y los otros cinco inhalaban aire filtrado, ya que había filtros acoplados a estas cámaras de exposición como, filtros HEPA, de carbón y óxidos de nitrógeno. Ambos grupos fueron expuestos a partículas o aire filtrado durante 3 días por semana durante 3 semanas, cumpliendo un total de 9 días de exposición, es decir 36 horas de exposición.

Al finalizar el último día de exposición, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico [60 mg/kg i.p. (Pisa, farmacéutica, México), hasta alcanzar un paro respiratorio. Posteriormente se insertó una cánula en la tráquea y se realizaron los lavados bronco-alveolares. Se instilaron 5 ml de solución fisiológica (37° C), durante un minuto y se recuperó lentamente, esto se realizó dos veces. El líquido se almacena a 4° C para su posterior conteo. Se realizó el conteo total de células y enseguida se elaboró el botón celular mediante el uso de una cito centrifuga (Cyto cent). Las laminillas se tiñeron con Giemsa siguiendo este procedimiento:

Técnica de Giemsa para frotis (células en medio líquido)

1. Fijar las laminillas con metanol (5-7min).
2. Secar al aire.
3. Diluir el colorante de Giemsa 1:20 con agua desionizada (el color puede variar de acuerdo a la dilución en el buffer).
4. Teñir durante 15-60min
5. Lavar en agua desionizada.
6. Dejar secar al aire y evaluar.

Las laminillas fueron observadas en un microscopio en campo claro (Zeiss Axio Scope A1, Zeiss). El conteo de macrófagos se llevó a cabo en estas mismas laminillas y se realizó una prueba de *t-student* para comparar ambos grupos (Primsa, Graphpad 5.0). Determinamos las diferencias significativas utilizando ($*p < 0.05$).

Resultados

Los animales inhalaron $506 \pm 42.34 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de partículas finas durante las 36 horas mientras que los animales expuestos a aire filtrado estuvieron expuestos a $0.075 \pm 0.014 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de partículas. Los animales que inhalaron partículas finas mostraron mayor porcentaje de macrófagos que el grupo control que inhaló aire filtrado (Figura 1). El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($*p < 0.05$) (Figura 2). El análisis morfológico de los macrófagos evidenció cuerpos de inclusión y su morfología correspondió a gránulos redondos, oscuros e individuales depositados en el interior de estas células, los cuales corresponden a las partículas finas inhaladas (Figura 3). Ninguno de los macrófagos presentó inclusiones lipídicas o cualquiera otro tipo de material en su citoplasma.

Discusión

En este trabajo evidenciamos que la exposición aguda a partículas finas concentradas incrementa el porcentaje de macrófago en los lavados bronco-alveolares. Además, estas partículas se evidenciaron en el interior de algunos macrófagos alveolares.

La cantidad de cuerpos extraños inhalados tiene como repercusión principal el aumento de células fagocitarias. En fumadores, los macrófagos alveolares se acumulan, sin embargo han mostrado serias deficiencias en el papel inmunitario (Monick et al., 2010). Además, se ha reportado que el depósito de material particulado en el pulmón induce una inflamación sistémica, la cual incluye la estimulación de la médula ósea. Esta respuesta ósea está relacionada con los mediadores liberados por los macrófagos alveolares como IL-1 β , IL-6, and GM-CSF (van Eeden et al., 2001). De esta manera, los macrófagos pueden migrar al sitio de lesión y acumularse en los espacios pulmonares. Por otra parte, no encontramos evidencia de inclusiones lipídicas dentro de los macrófagos, conocidos como macrófagos espumosos. Es decir, que la exposición a partículas finas durante este tiempo no produjo proteinosis alveolar pulmonar o la generación de algún granuloma de colesterol (Lee et al., 1985). La única inclusión observada fueron las partículas redondas, oscuras y no aglomeradas. Otros estudios

han evidenciado grandes cúmulos de partículas finas dentro de los macrófagos alveolares, tanto en lavados bronco-alveolares como en alveolos de cortes histológicos (Hussain et al., 2011). Probablemente, no encontramos grandes cúmulos de partículas debido al esquema de inhalación subagudo (36 h), el cual no permitió el depósito de altas concentraciones de partículas finas en el pulmón. Otra hipótesis que resulta de este estudio, es la actividad del mecanismo de limpieza mucociliar en los animales, el cual podría haber eliminado parte del contenido inhalado a lo largo del aparato respiratorio. Además, se reportó que la acumulación de partículas en el pulmón disminuye notablemente a través del tiempo, incluso la sobrecarga pulmonar es diferentes entre modelos animales (Bermudez et al., 2004). Sin embargo, la vía de administración también juega un papel importante, ya que la cantidad de partículas depositadas y daño es más severo cuando las partículas son administradas de manera intra-traqueal más que cuando son inhaladas, el cual puede ser debido a las agregaciones de los diferentes tamaños de las partículas y la distribución a lo largo del árbol bronquial (Li et al., 2007). Morfológicamente, nuestras imágenes de macrófagos son parecidas al estudio de Kulkarni et al. (2005), el cual demostró partículas redondas, oscuras y solas en macrófagos de esputo de personas adultos residentes de Reino Unido expuestos a bajas concentraciones de partículas de carbón. El macrófago pulmonar es una célula versátil. ya que limpia, fagocita, limpia, vigila y mantiene buena armonía entre todos los elementos dentro de pulmones.

Conclusiones

El macrófago pulmonar es una célula importante ya que mantiene un equilibrio inmunológico dentro del pulmón, fagocita elementos extraños, especialmente partículas contaminantes. Los modelos animales de instilación intra-traqueal o intra-nasal no incluyen una vía similar a los humanos, ya que las partículas no siguen el propio movimiento desde las fosas nasales hasta los alveolos pulmonares como lo demostramos en nuestro modelo. Además, es importante continuar investigando el proceso de fagocitosis y las partículas en un modelo inhalatorio.

Bibliografía

- Adelman D.C., Casale T.B. and Corren J. Alergia e inmunología. 2005.
- Becker S., Soukup J.M., Sioutas C. and Cassee F.R. Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Experimental Lung Research*. 2003;29(1):29-44.
- Bermudez E., Mangum J.B., Wong B.A., Asgharian B., Hext P.M., Warheit D.B. and Everitt J.I. Pulmonary Responses of Mice, Rats, and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles. *Toxicological Sciences*. 2004;77(2):347-357.
- Castell J.V., Donato M.T. and Gómez-Lechón M.J. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2005;57:189-204.
- Fels A.O. and Cohn Z.A. The alveolar macrophage. *Journal of Applied Physiology*. 1986;60(2):353.
- Gottipolu R.R., Wallenborn J.G., Karoly E.D., Schladweiler M.C., Ledbetter A.D., Krantz T., Linak W.P., Nyska A., Johnson J.A. and Thomas R. One-month diesel exhaust inhalation produces hypertensive gene expression pattern in healthy rats. *Environmental Health Perspectives*. 2009;117(1):38.
- Hussain S., Vanoirbeek J.A., Luyts K., De Vooght V., Verbeken E., Thomassen L.C., Martens J.A., Dinsdale D., Boland S. and Marano F. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *European Respiratory Journal*. 2011;37(2):299-309.
- Katavolos P., Ackerley C., Viel L., Clark M., Wen X. and Bienzle D. Clara cell secretory protein is reduced in equine recurrent airway obstruction. *Veterinary Pathology Online*. 2009;46(4):604-613.
- Kulkarni N.S., Prudon B., Panditi S.L., Abebe Y. and Grigg J. Carbon loading of alveolar macrophages in adults and children exposed to biomass smoke particles. *Science of the Total Environment*. 2005;345(1):23-30.
- Lee K., Trochimowicz H. and Reinhardt C. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1985;79(2):179-192.
- Li J.G., Li W.X., Xu J.Y., Cai X.Q., Liu R.L., Li Y.J., Zhao Q.F. and Li Q.N. Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environmental toxicology*. 2007;22(4):415-421.
- Monick M.M., Powers L.S., Walters K., Lovan N., Zhang M., Gerke A., Hansdottir S. and Hunninghake G.W. Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. *The Journal of Immunology*. 2010;185(9):5425-5435.
- Mossman B.T., Lippmann M., Hesterberg T.W., Kelsey K.T., Barchowsky A. and Bonner J.C. Pulmonary endpoints (lung carcinomas and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2011;14(1-4):76-121.
- Pavek P. and Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current drug metabolism*. 2008;9(2):129-143.
- Pérez F., Méndez A., Lagos A. and Vargas S.L. Dinámica y patología del barrido mucociliar como mecanismo defensivo del pulmón y alternativas farmacológicas de tratamiento. *Revista médica de Chile*. 2014;142(5):606-615.
- Soukup J.M. and Becker S. Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicology and applied pharmacology*. 2001;171(1):20-26.

Takenaka S., Karg E., Roth C., Schulz H., Ziesenis A., Heinzmann U., Schramel P. and Heyder J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect.* 2001;109(4):547.

van Eeden S.F., Tan W.C., Suwa T., Mukae H., Terashima T., Fujii T., Qui D., Vincent R. and Hogg J.C. Cytokines Involved in the Systemic Inflammatory Response Induced by Exposure to Particulate Matter Air Pollutants (PM10). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2001;164(5):826-830.

Anexos

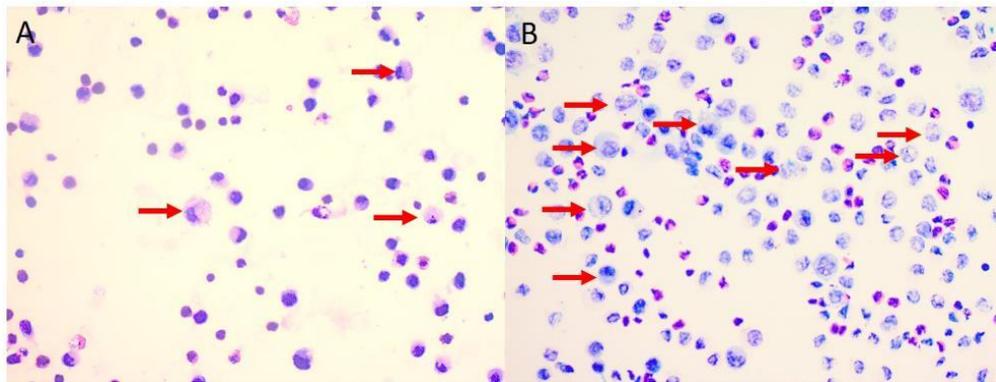


Figura 1. Macrófagos de lavados bronco-alveolares teñidos con Giemsa. A) Lavado bronco-alveolar de un animal expuesto a aire filtrado. B) Lavado bronco-alveolar de un animal expuesto a partículas finas. Las flechas en color rojo señalan los macrófagos. Imagen 400X.

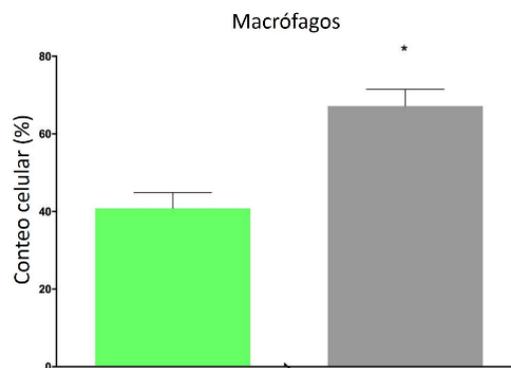


Figura 2. Porcentaje de macrófagos en lavados bronco-alveolares. Los animales expuestos a partículas finas incrementaron significativamente después de la inhalación (* $p < 0.05$).

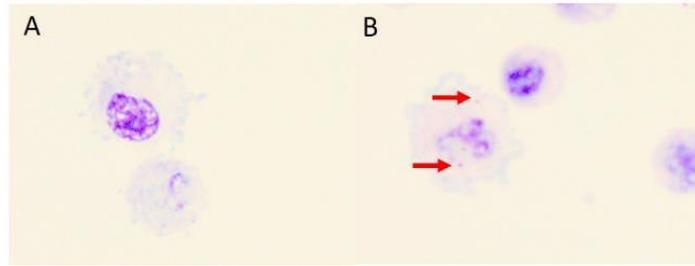


Figura 3. Macrófagos de lavados broncho-alveolares. A) Macrófagos de animales expuestos a aire filtrado. B) Macrófagos de animales expuestos a partículas finas concentradas. Las flechas en color rojo señalan las inclusiones de partículas finas. Imagen 600X.