

**ESTUDIO HISTOQUIMICO E INMUNOHISTOQUIMICO
DE LOS MACROFAGOS CEREBRALES**

**HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL
STUDY ON BRAIN MACROPHAGES**

J. BOYA, A. BORREGON, A.L. CARBONELL y J. CALVO

Departamento de Histología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid

RESUMEN

La naturaleza de las células fagocitarias que aparecen en las lesiones del sistema nervioso central no está aclarada. Hemos estudiado el origen de estos macrófagos en una herida cerebral experimental en la rata adulta. Se emplearon técnicas histoquímicas para fosfatasa ácida, peroxidasa y butirato esterasa (con y sin adición de fluoruro sódico al medio de incubación), y una técnica inmunohistoquímica para lisozima. Los resultados obtenidos muestran la existencia de dos poblaciones macrofágicas: elementos microgliales endógenos y células hematógenas (monocitos).

Palabras Clave:

Macrófagos cerebrales. Microglía. Monocito. Fosfatasa ácida. Peroxidasa. Esterasa. Lisozima. Rata.

SUMMARY

The nature of phagocytes appearing in lesions of the central nervous system is not yet clear. We have studied the origin of these macrophages in an experimental brain stab wound in the adult rat. Histochemical techniques for acid phosphatase, peroxidase and butyrate esterase (with and without addition of sodium fluoride to the incubating medium), and an immunohistochemical technique for lysozyme, were used for our study. The results obtained showed the existence of two macrophage populations: endogenous microglial elements and hematogenous cells (monocytes).

Key Words:

Cerebral macrophages. Microglia. Monocyte. Acid phosphatase. Peroxidase. Esterase. Lysozyme. Rat.

INTRODUCCION

Las lesiones traumáticas del sistema nervioso central van acompañadas de la aparición de numerosos fagocitos en el área dañada. La naturaleza de estos macrófagos no ha sido dilucidada. Se han propuesto dos posibles fuentes para estas células. Para algunos autores (2, 7, 9, 10, 11, 12, 15) los macrófagos cerebrales son enteramente de origen exógeno, derivando de monocitos sanguíneos. Otros estudios, por el contrario, aportan evidencias de una formación de los macrófagos cerebrales a partir de elementos endógenos del tejido nervioso, principalmente células microgliales (1, 3, 17, 20, 23, 25). Esta controversia no puede resolverse mediante métodos morfológicos, dado que los macrófagos plenamente desarrollados carecen de características ultraestructurales distintivas que permitan identificar el tipo celular del que se originaron.

Nosotros hemos estudiado previamente la reacción macrofágica alrededor de una herida cerebral experimental, utilizando técnicas de impregnación argéntica para microglia así como técnicas histoquímicas para fosfatasa ácida y peroxidasa (4). Nuestros resultados sugirieron que los macrófagos cerebrales pueden derivar de dos fuentes: exógena o monocítica y endógena o microglial.

Además de la peroxidasa, los monocitos sanguíneos y los macrófagos derivados de los mismos presentan otros marcadores enzimáticos tales como la butirato esterasa y la lisozima. La butirato esterasa es considerada como uno de los marcadores más útiles en la identificación de fagocitos (13, 14). La sensibilidad de la actividad de esta enzima a la inhibición con el fluoruro sódico (NaF) permite distinguir entre tipos de macrófagos (21). De este modo, la actividad butirato esterasa en los monocitos se inhibe con el NaF, mientras que en los macrófagos tisulares esta actividad es NaF resistente (5, 14). La lisozima es un enzima bacteriolítico, abundante en las células de la serie mieloide (6, 16, 18, 22). La actividad lisozima no se ha descrito en células microgliales. Así, la determinación de todas estas actividades enzimáticas puede aportar nuevas evidencias acerca del origen de los macrófagos cerebrales.

En el presente estudio exponemos nuestros hallazgos acerca del origen de los macrófagos en la herida cerebral

experimental, utilizando métodos histoquímicos para las actividades fosfatasa ácida, peroxidasa y butirato esterasa, y un método inmunohistoquímico para determinación de lisozima.

MATERIAL Y METODOS

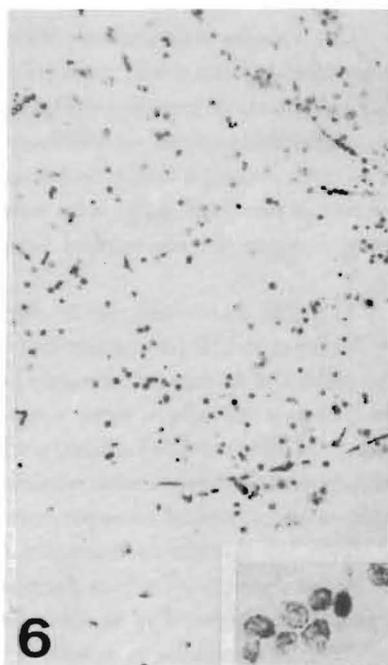
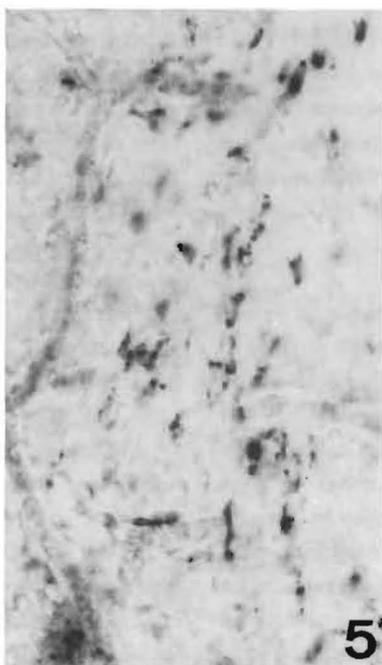
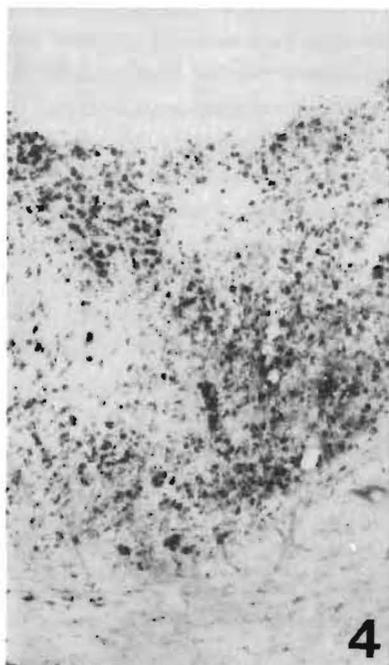
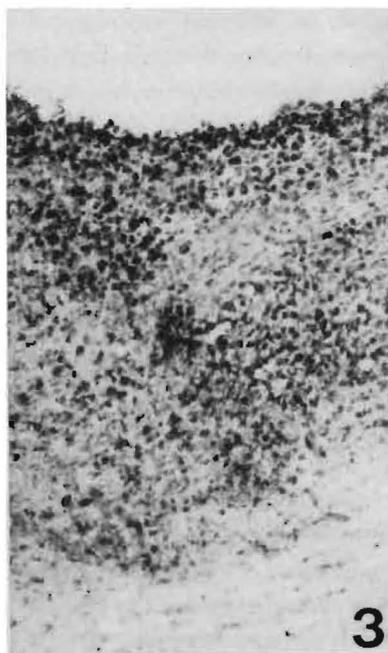
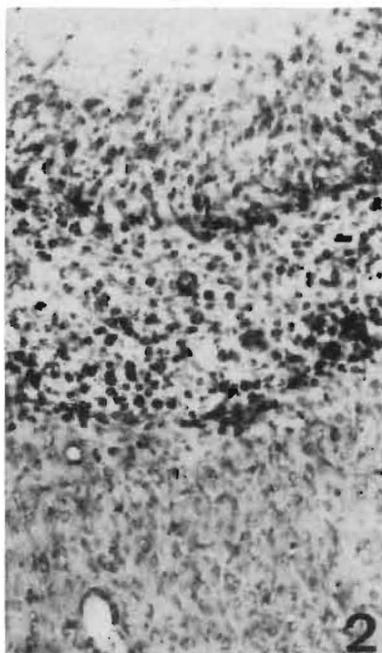
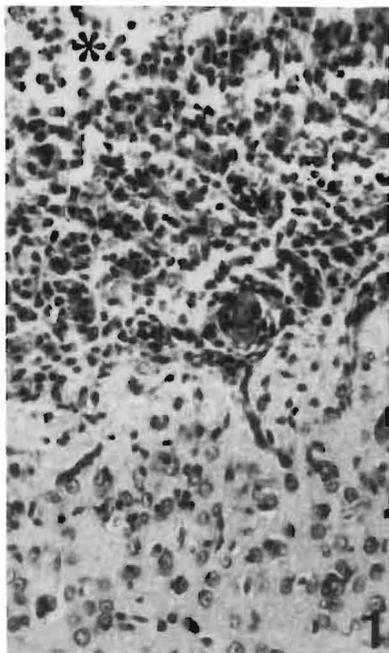
Se emplearon 10 ratas albinas Wistar, de 3 meses de edad. Bajo anestesia etérea, se les practicó una punción cerebral bilateral. A través de dos orificios localizados 3 mm. por detrás de la sutura fronto-parietal se introdujo una aguja estéril candente hasta 4 mm. de profundidad, verticalmente desde la calota.

Cinco días después de la lesión, los animales se sacrificaron por decapitación bajo anestesia. Los cerebros se fijaron por inmersión en líquido de Bouin durante 24 horas (2 ratas), o en glutaraldehído al 2% en buffer cacodilato 0.1M pH 7.2, durante 14 horas a 4° C. (8 ratas).

Cortes de parafina de 7 micras del tejido fijado en líquido de Bouin se tiñeron con hematoxilina-eosina, para su examen de rutina con microscopía óptica.

Las muestras fijadas en glutaraldehído se lavaron durante 8 horas a 4° C en buffer cacodilato 0.1M, pH 7.2. Se emplearon cortes de congelación para demostrar las actividades fosfatasa ácida, peroxidasa y butirato esterasa. Las técnicas se desarrollaron según los métodos descritos previamente por Miller y Palade (19), Fahimi (8) y Tucker et al. (24), respectivamente. La inhibición de la actividad butirato esterasa se realizó incubando los cortes de tejido en un medio suplementado con NaF a 0.04M (1.5 mg/ml), tal y como ha sido descrito por otros autores (5, 14).

La localización inmunohistoquímica de la lisozima se determinó siguiendo un método peroxidasa-antiperoxidasa, como ha sido descrito previamente por Pinkus y Said (22). La reacción se desarrolló sobre cortes de parafina de tejido fijado durante 12 horas en formol al 10% a 4° C. Como primer anticuerpo se utilizó antisuero de conejo antiliszozima (Dakopatts, Denmark), diluido al 1:400 en buffer fosfato salino (PBS) (pH 7.2), con un 1% de ovoalbúmina y un 5% de suero de cerdo normal. La incubación se reali-



zó en cámara húmeda a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Como segundo y tercer anticuerpos, respectivamente, se utilizaron inmunoglobulinas de cerdo anti-inmunoglobulinas de conejo (Dakopatts, Denmark), y complejo peroxidasa-antiperoxidasa de conejo (Dakopatts, Denmark), diluidos al 1:35 y al 1:250 en PBS, durante 15 minutos cada uno. Después de reaccionar con 3-3'Diaminobencidina, los cortes se deshidrataron, aclararon, y se montaron con DePex.

Todos los cortes se realizaron según un plano perpendicular al trayecto de la punción.

RESULTADOS

En los cortes teñidos con hematoxilina-eosina, el área necrótica central que deja la lesión está rodeada por una gruesa banda de células macrofágicas. El parénquima nervioso circundante a dicha banda aparece más celular comparado con el tejido nervioso adyacente no dañado (Fig. 1).

Con la técnica histoquímica de Miller y Palade (19) para la actividad fosfatasa ácida, se observa una fuerte positividad en la banda de macrófagos (Fig. 2), así como numerosas células fosfatasa ácida —positivas en el parénquima nervioso más cercano a la herida. Se detecta además una fuerte positividad pericitaria tanto en las regiones cercanas a la lesión como en el tejido cerebral indemne.

El patrón de reacción que se objetiva con la técnica de Tucker et al. (24) para la actividad butirato esterasa es casi idéntico al descrito anteriormente para la fosfatasa ácida. La banda macrofágica muestra una intensa positividad (Fig. 3). El tejido nervioso localizado por fuera de esta banda también posee células butirato esterasa-positivas, situadas tanto en el parénquima como perivascularmente. Cuando se añade NaF al medio de incubación, el número de células butirato esterasa —positivas disminuye ligeramente en la banda macrofágica (Fig. 4); sin embargo, la positividad de las células localizadas en el tejido nervioso por fuera de la banda de macrófagos no sufre cambios aparentes (Fig. 5).

Con la técnica de Fahimi (8) para la actividad peroxidasa, únicamente un pequeño número de macrófagos pre-

sentan gránulos intracitoplásmicos peroxidasa-positivos (Fig. 6). No se encuentran células con gránulos peroxidasa-positivos en el parénquima nervioso que rodea a la banda de macrófagos, si bien todos los eritrocitos están intensamente teñidos debido a la actividad pseudoperoxidática de su hemoglobina.

Con la técnica inmunohistoquímica de Pinkus y Said (22), en la banda macrofágica existen algunas células con positividad citoplásmica para lisozima (Fig. 7). Alguna de ellas tiene la forma redondeada típica de los corpúsculos gránulo-adiposos. No se encuentran células lisozima-positivas en el parénquima nervioso adyacente a la banda de macrófagos.

DISCUSION

De acuerdo con nuestros resultados, a los cinco días de una herida cerebral experimental existe una bien definida y gruesa banda de macrófagos globulosos alrededor de la lesión. El patrón enzimático de esta banda es el siguiente: prácticamente todos los macrófagos muestran actividad fosfatasa ácida y butirato esterasa. El número de macrófagos con actividad butirato esterasa sensible al NaF es reducido, ya que al añadir este compuesto al medio de incubación se observan pocos cambios en la cantidad de células positivas. También es escaso el número de fagocitos que poseen actividad lisozima. Finalmente, la actividad peroxidasa está presente únicamente en un pequeño número de células de la banda de macrófagos. Los presentes resultados confirman los obtenidos previamente en relación con las actividades fosfatasa ácida y peroxidasa (4).

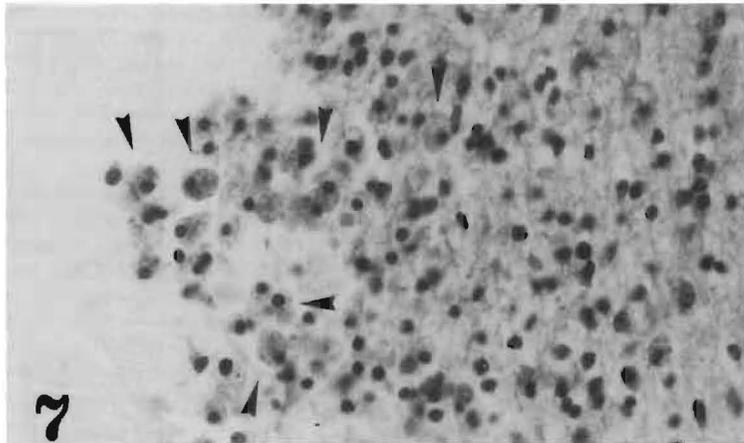
Así pues, observamos que el perfil enzimático que se encuentra en la banda macrofágica se caracteriza por una amplia e intensa positividad para aquellas enzimas (fosfatasa ácida y butirato esterasa) presentes en todos los macrófagos. Sin embargo, los marcadores enzimáticos específicos tanto de monocitos como de macrófagos derivados de los mismos (peroxidasa, lisozima y butirato esterasa sensible al NaF), solo aparecen en parte de los macrófagos. El pequeño número de macrófagos peroxidasa-positivos podría explicarse, según Blinzinger et al. (2), por una pérdida de la actividad enzimática en los monocitos fagocitando activa-

mente. Tal y como se discutió en nuestro estudio previo (4), el parénquima nervioso alrededor de la herida debería mostrar entonces monocitos emigrando que todavía no hubieran fagocitado intensamente (todavía peroxidasa-positivos), mientras que los macrófagos derivados de monocitos de las áreas más dañadas ya podrían carecer de tal actividad enzimática. Pero de acuerdo con nuestros resultados, las células peroxidasa-positivas están siempre localizadas en estrecha proximidad al foco necrótico central, y no en el parénquima nervioso cercano. Por otro lado, una pérdida de actividad enzimática similar no se ha descrito para la butirato esterasa ni para la lisozima.

Los resultados obtenidos parecen pues confirmar la presencia en el cerebro lesionado de una población de macrófagos endógenos no monocíticos, cuyo origen podría ser atribuido a células microgliales.

Un importante hallazgo de este estudio es la aparición, en el parénquima nervioso cercano a la herida, de células con actividad fosfatasa ácida y butirato esterasa resistente al NaF. En esas mismas regiones se detecta una hiper celularidad en los cortes teñidos con técnicas de rutina, y —tal como se demostró en nuestro estudio previo (4)— microglía activada típica en los cortes teñidos con técnicas argénticas.

Con ninguno de los marcadores enzimáticos para monocitos incluidos en este estudio se han visto células positivas por fuera de la banda de macrófagos. Así pues, estas células con positividad para la fosfatasa ácida y para la butirato esterasa (resistente al NaF) halladas en el parénquima nervioso por fuera de la banda macrofágica, pueden tener un origen endógeno, probablemente a partir de células microgliales.



- Figura 1.— Sección transversal de la lesión. Banda hiper celular de macrófagos en la vecindad de la herida (asterisco). P: parénquima nervioso adyacente. (H.-E.). (x320).
- Figura 2.— Actividad fosfatasa ácida. Obsérvese la existencia de abundantes células macrofágicas intensamente positivas. (x240).
- Figura 3.— Actividad butirato esterasa. Numerosas células positivas en la banda macrofágica. (x200).
- Figura 4.— Actividad butirato esterasa con NaF en el medio de incubación. La cantidad de células positivas a esta reacción es discretamente menor que en el caso de la incubación sin NaF. (x200).
- Figura 5.— Actividad butirato esterasa con NaF en el medio de incubación. Células positivas situadas en el parénquima nervioso a determinada distancia de la lesión. (x820).
- Figura 6.— Actividad peroxidasa. Existencia de macrófagos peroxidasa-positivos en la banda de reacción fagocitaria. (x220). Recuadro: detalle de macrófagos con granulaciones peroxidasa-positivas. (x680).
- Figura 7.— Actividad lisozima. Presencia de células lisozima-positivas en la banda de macrófagos (flechas). (x420). Recuadro: detalle de macrófago con fuerte positividad granular citoplásmica para lisozima. (x1000).

BIBLIOGRAFIA

- 1.— BARON, M. and GALLEGRO, A. (1972): The relation of the microglia with the pericytes in the cerebral cortex. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 128: 42-57.
- 2.— BLINZINGER, K.H.; HERRLINGER, H.; LUH, S. and ANZIL, A.P. (1978): Ultrastructural cytochemical demonstration of peroxidase-positive monocyte granules: an additional method for studying the origin of mononuclear cells in encephalitic lesions. *Acta Neuropathol.*, 43: 55-61.
- 3.— BOYA, J. (1976): An ultrastructural study of the relationship between pericytes and cerebral macrophages. *Acta Anat.*, 95: 598-608.
- 4.— BOYA, J.; CALVO, J.; CARBONELL, A.L. and GARCIA-MAURINO, E. (1986): Nature of macrophages in rat brain. A histochemical study. *Acta Anat.* 127: 142-145.
- 5.— BOZDECH, M.J. and BAINTON, D.F. (1981): Identification of α -naphthyl butyrate esterase as a plasma membrane ectoenzyme of monocytes and as a discrete intracellular membrane-bounded organelle in lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 153: 182-195.
- 6.— BRAUNHUT, S.J.; BLANC, W.A., RAMANARAYANAN, M., MARBOE, C. and MESATEJADA, R. (1984): Immunocytochemical localization of lysozyme and alpha-1-antichymotrypsin in the term human placenta. *J. Histochem. Cytochem.*, 32: 1204-1210.
- 7.— DEL CERRO, M. and MONJAN, A.A. (1979): Unequivocal demonstration of the hematogenous origin of brain macrophages in a stab wound by a double-label technique. *Neuroscience*, 4: 1399-1404.
- 8.— FAHIMI, H.D. (1969): Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J. Cell Biol.*, 43: 275-288.
- 9.— HUNTINGTON, H.W. and TERRY, R.D. (1966): The origin of reactive cells in cerebral stab wounds. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 25: 646-653.
- 10.— IMAMOTO, K. and LEBLOND, C.P. (1977). Presence of labeled monocytes, macrophages and microglia in a stab wound of the brain following an injection of bone marrow cells labeled with ^3H -uridine into rats. *J. Comp. Neurol.*, 174: 255-279.
- 11.— KITAMURA, T. (1980): Dynamic aspects of glial reactions in altered brains. *Path. Res. Pract.*, 168: 301-343.
- 12.— KONIGSMARK, S.W. and SIDMAN, R.L. (1963). Origin of brain macrophages in the mouse. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 22: 643-676.
- 13.— KREIPE, H., RADZUN, H.J. and PARWARESCH, M.R. (1986). Phenotypic differentiation patterns of the human monocyte/macrophage system. *Histochem. J.*, 18: 441-450.
- 14.— LI, C.Y.; LAM, K.W. and YAM, L.T. (1973): Esterase in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, 21: 1-12.
- 15.— LING, E.A. (1979): Electron microscopic study of macrophages appearing in a stab wound of the brain of rats following intravenous injection of carbon particles. *Arch. Histol. Jpn.*, 42: 41-50.
- 16.— MASON, D.Y. and TAYLOR, C.R. (1975): The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. *J. Clin. Pathol.*, 28: 124-132.
- 17.— MAXWELL, D.S. and KRUGER, L. (1965): Small blood vessels and the origin of phagocytes in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation. *Exp. Neurol.*, 12: 33-54.
- 18.— MENDELSON, G.; EGGLESTON, J.C. and MANN, R.B. (1980): Relationship of lysozyme (muramidase) to histiocytic differentiation in malignant histiocytosis. An immunohistochemical study. *Cancer*, 45: 273-279.
- 19.— MILLER, F. and PALADE, G.E. (1964): Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron-microscopical cytochemical study. *J. Cell Biol.*, 23: 519-552.
- 20.— MORI, S. and LEBLOND, C.P. (1969): Identification of microglia in light and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.*, 135: 57-80.
- 21.— MUSSON, R.A. (1983): Human serum induces maturation of human monocytes in vitro. Changes in cytolytic activity, intracellular lysosomal enzymes and non-specific esterase activity. *Am. J. Pathol.*, 111: 331-340.
- 22.— PINKUS, G.S. and SAID, J.W. (1977): Profile of intracytoplasmic lysozyme in normal tissues, myeloproliferative disorders, hairy cell leukemia, and another pathologic processes. An immunoperoxidase study of paraffin sections and smears. *Am. J. Pathol.*, 98: 351-366.
- 23.— TORVIK, A. (1975): The relationship between microglia and brain macrophages. Experimental investigations. *Acta Neuropathol.*, Suppl. 6: 297-300.
- 24.— TUCKER, S.B.; PIERRE, R.V. and JORDON, R.E. (1977): Rapid identification of monocytes in a mixed mononuclear cell preparation. *J. Immunol. Meth.*, 14: 267-269.
- 25.— VAUGHN, J.E.; LOWARY, P. and SKOFF, R.P. (1970): Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerve. I. The multipotential glia. *J. Comp. Neurol.*, 140: 175-206.