

Inhibición de la liberación de histamina en mastocitos de pulmón y de intestino de perro por el isoproterenol

M. R. Vieytes, L. F. de la Cruz y L. M. Botana^{1*}

Departamentos de Fisiología y de Farmacología¹
Facultad de Veterinaria
E-27002 Lugo (España)

(Recibido el 30 de agosto de 1990)

M. R. VIEYTES, L. F. DE LA CRUZ and L. M. BOTANA. *Histamine Release Inhibition in Dog Lung and Gut Mast Cells by Isoproterenol*. Rev. esp. Fisiol, 47 (1), 19-24, 1991.

Enzymatically isolated dog lung and gut mast cells were stimulated with compound 48/80, ionophore A23187, concanavalin A and FNa-Ca. Cell response elicited by A23187, concanavalin A or 48/80 is almost completely inhibited by isoproterenol. Concanavalin A induced histamine release on gut mast cells is high, indicating an elevated degree of sensitization of these cells. Results point to the existence of beta adrenergic inhibitory activity on dog lung and gut mast cells.

Key words: Mucous mast cells, β -Adrenergic, NaF, Ca, Concanavalin A, Ionophore A23187.

Los mastocitos son células con precursores mal conocidos que intervienen en las reacciones de alergia, hipersensibilidad inmediata y en diversos procesos patológicos (8). Presentan heterogeneidad, tanto funcional como histológica; se pueden dividir en dos tipos, mucosos y conectivos, con características farmacológicas e histológicas distintas (7). Dentro de cada tipo, las células presentan diferencias de

comportamiento farmacológico según su origen anatómico. La heterogeneidad de los mastocitos tiene importantes implicaciones clínicas, ya que la acción de un fármaco en un determinado modelo de mastocito puede no ser extrapolable a otra población distinta, y esto es todavía más importante cuando las conclusiones basadas en los resultados obtenidos en animales pretenden ser extrapoladas a los humanos. Por tanto, es importante estudiar cada modelo celular por separado. En trabajos previos se ha estudiado la actividad beta adrenérgica en distintas poblaciones de

* A quien debe dirigirse la correspondencia:
Johns Hopkins Asthma and Allergy Ctr., Unit Office 2, 301 Bayview Bld., Baltimore, MD 21224 (USA)

mastocitos de rata. La actividad beta adrenérgica es inhibidora en las poblaciones pleural y peritoneal (2, 3), es inhibidora a nivel sistémico (4), y parece no existir en la población de mastocitos de pulmón (10). En el presente trabajo describimos la actividad inhibidora del isoproterenol en mastocitos de pulmón e intestino de perro.

Material y Métodos

Los medios fisiológicos empleados para la manipulación de los mastocitos, así como la técnica fluorimétrica para la determinación de la liberación de histamina, han sido descritos previamente (2-4). Las incubaciones en presencia de los estímulos se prolongan durante 10-15 min. Las preincubaciones de las células se realizan durante 10 min.

Obtención de los mastocitos de intestino de perro. — Los mastocitos se obtienen mediante dispersión enzimática con colagenasa, siguiendo una combinación de las técnicas descritas por ENNIS (5) y BARRETT y METCALFE (1). Se sacrifica al animal con una sobredosis de pentobarbital y se toma una porción de unos 20 cm de intestino delgado, que se lava repetidas veces con solución salina, para eliminar moco y excrementos. Se seca sobre papel de filtro y se corta en pequeños fragmentos de 1 g, que se lavan con solución Umbreit sin calcio ni magnesio y con EGTA 10 μ M, durante 10 min, con agitación a 37 °C, en la proporción 7-10 g de tejido por 25 ml de solución. Se hace un segundo lavado con solución de Umbreit con N-acetil-l-cisteína 50 mM, durante 1 min, a 37 °C, para suprimir mucosidades. Se lava nuevamente durante 20 min, se corta en fragmentos de 1 mm y se procede a la digestión enzimática. En un matraz de plástico de 50 ml se incuban 7-10 g de tejido en 25 ml de solución de Umbreit, con 1 mg/ml de proteína (albúmina bovina) y colagenasa (25

mg/25 ml) con agitación a 37 °C durante 90 min. Tras la dispersión del tejido mediante succión con jeringa de plástico de 10 ml, se filtra el tejido por una gasa previamente humedecida en solución de Umbreit, y el líquido resultante, que contiene las células obtenidas por la dispersión enzimática, es lavado tres veces con la misma solución.

Todos los ensayos con concanavalina A se realizaron en presencia de 10 μ g/ml de fosfatidilserina.

Obtención de los mastocitos de pulmón de perro. — La obtención de los fragmentos de tejido, para la digestión enzimática, y los detalles del método han sido descritos previamente (10).

Viabilidad celular y citotoxicidad. — La viabilidad celular y la citotoxicidad de los fármacos empleados se determina mediante la técnica de exclusión del azul tripano, previamente descrita (3).

Todos los reactivos empleados son de Sigma.

Todos los datos son analizados empleando el test *t* de Student para datos no apareados. Se consideran significativos valores de $p < 0,01$. Todos los datos fueron obtenidos como mínimo cuatro veces por duplicado o triplicado, y se presentan como media y error estándar de la media (SEM). Se representan sólo los SEM superiores a 4.

Resultados

Mastocitos de pulmón. — Los mastocitos estimulados con calcio y previamente sensibilizados con FNa 10 mM liberan hasta un 19 % de histamina, con valores de respuesta máximos a partir de concentraciones de calcio de 2 mM. La respuesta comienza a manifestarse con calcio 0,1 mM (fig. 1). El compuesto 48/80 produce la respuesta máxima (16 %), con 5 μ g/ml (fig. 2), y la concentración necesaria para

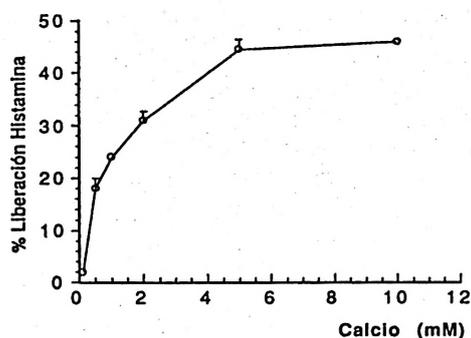


Fig. 1. Liberación de histamina en mastocitos de pulmón de perro preincubados durante 10 min con FNa 10 mM y estimulados a continuación con calcio.

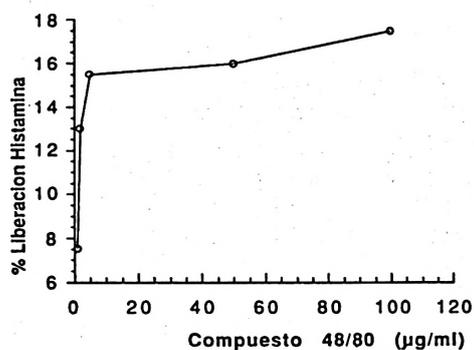


Fig. 2. Liberación de histamina en mastocitos de pulmón de perro estimulados con distintas concentraciones de compuesto 48/80.

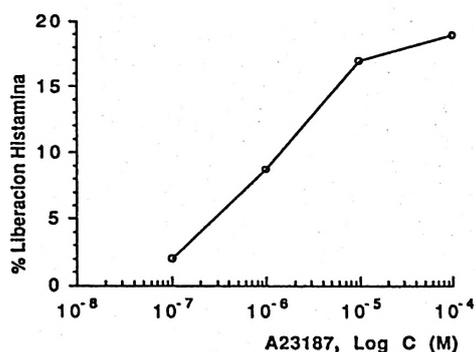


Fig. 3. Liberación de histamina en mastocitos de pulmón de perro estimulados con ionóforo A23187.

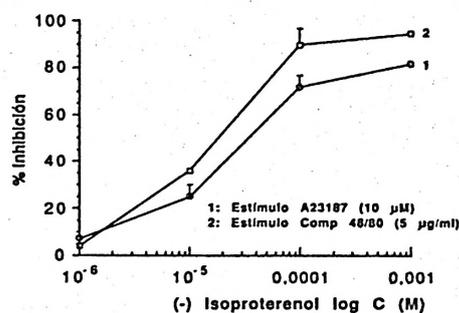


Fig. 4. Inhibición de la liberación de histamina producida por el ionóforo A23187 o el compuesto 48/80 en presencia de distintas concentraciones de (-)-isoproterenol.

activar la respuesta es de 1 µg/ml. El ionóforo A23187 comienza a producir respuesta a partir de 100 nM, y la respuesta es máxima con 10 µM, con valores de secreción de 20 % en la meseta de la curva (fig. 3). En presencia de isoproterenol, la respuesta producida por el ionóforo A23187 se anula casi completamente y hasta un 80 % con el 48/80 (los dos últimos puntos en las dos curvas son significativamente distintos) (fig. 4).

Mastocitos de intestino. — La figura 5 muestra el perfil de respuesta obtenido al estimular las células con distintas concentraciones de concanavalina A. La respues-

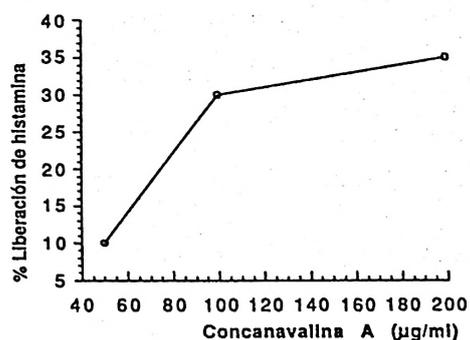


Fig. 5. Liberación de histamina en mastocitos de intestino de perro, estimulados con concanavalina A.

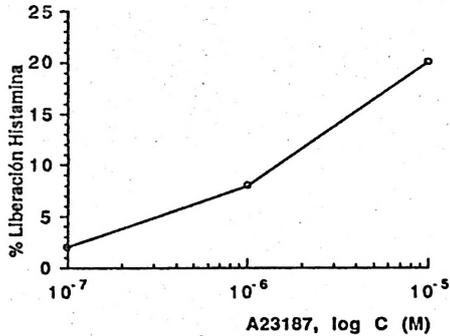


Fig. 6. Liberación de histamina en mastocitos de intestino de perro, estimulados con ionóforo A23187.

ta se inicia con 40 $\mu\text{g/ml}$, se dispara con 80 $\mu\text{g/ml}$, y la meseta se alcanza con 100 $\mu\text{g/ml}$. La respuesta máxima es del 30 %. Cuando el estímulo es el ionóforo A23187, la respuesta máxima se obtiene con 10 μM , y corresponde a un 20 %. La secreción de histamina es apreciable a partir de 100 nM, y se dispara con 1 μM (figura 6).

En la figura 7 se muestran los perfiles correspondientes a la inhibición que el isoproterenol produce en la respuesta al ionóforo o a la lectina. La inhibición es

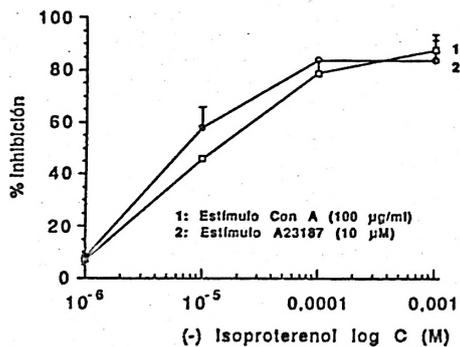


Fig. 7. Inhibición producida por el isoproterenol en la respuesta de los mastocitos de mucosa intestinal de perro a la concanavalina A (1) y ionóforo A23187 (2).

prácticamente total a partir de 100 μM , tanto para la respuesta producida por la lectina como por el ionóforo.

Para comprobar el posible bloqueo selectivo de la acción del isoproterenol, se empleó propranolol 10 μM . Concentraciones inferiores no mostraron acción alguna, y con 10 μM la respuesta obtenida no fue significativamente distinta de la obtenida con el fármaco estimulante en ausencia de isoproterenol, aunque los errores estándar fueron muy superiores, en torno al 10 %.

Discusión

La farmacología *in vitro* de los distintos subtipos de mastocitos de perro no ha sido estudiada hasta el momento. El interés del estudio en mastocitos de intestino radica en dos aspectos, por una parte esta es la primera vez que se describe la existencia de actividad adrenérgica inhibitoria en mastocitos de mucosa intestinal de perro y, también, que estas células se emplean como modelo celular para el estudio de la exocitosis. Asimismo, este trabajo es el primero en el que se emplean los mastocitos de pulmón de perro como modelo celular para el estudio de la actividad β -adrenérgica y de la respuesta a fármacos utilizados en la bioquímica de la exocitosis.

Los resultados muestran que la concanavalina A produce respuesta en mastocitos de mucosa intestinal de perro. La respuesta es bastante elevada, ya que es similar a la de los mastocitos conectivos de rata (aproximadamente un 30 %). Los mastocitos de pulmón de rata responden como máximo un 20 % a la concanavalina. Dado que ésta actúa uniéndose a los azúcares de las IgE unidas a los receptores Fc de la membrana plasmática de los mastocitos (6), la respuesta de los mastocitos de mucosa intestinal de perro indica que el nivel de sensibilización de estas células es elevado, lo cual es lógico si se tiene en

cuenta el importante papel que los mastocitos intestinales tienen en la supresión de portadores antigénicos en el intestino.

Los mastocitos de pulmón sensibilizados con FNa responden al calcio siguiendo un típico perfil dosis-respuesta, aunque con un grado de respuesta muy bajo, si se compara con los mastocitos de la cavidad pleural o peritoneal de rata (hasta un 70 % de respuesta) o con los de pulmón de rata (10) (hasta un 40 %). Esto indica que los mecanismos dependientes del calcio son menos activos que en los otros modelos celulares, aunque es un hecho bien conocido la baja respuesta de los mastocitos mucosos a la mayoría de los estímulos. Aunque en el caso de este modelo celular concreto, la respuesta es particularmente baja para todos los estímulos, lo cual se confirma también con el ionóforo A23187 o el compuesto 48/80.

Los valores de respuesta máxima en las células de pulmón en los datos de movilización de calcio coinciden en el caso del ionóforo y la activación con FNa, lo que indica que ambos están, posiblemente, modulando las mismas rutas bioquímicas, ya que alguna ruta que moviliza calcio puede generar respuestas cuantitativamente muy distintas, como es el caso de la respuesta mediada por agentes que activan la protein kinasa C (WARNER and MACGLASHAN, in preparation).

La inhibición que el isoproterenol ejerce sobre la respuesta al A23187, la concanavalina A o el 48/80 apoya la existencia de actividad adrenérgica de tipo beta. Esta hipótesis se confirma por el hecho de que el (LD)isoproterenol apenas inhibe la respuesta al A23187, la concanavalina A o el 48/80 (datos no publicados). Sin embargo, es importante tener en cuenta que las concentraciones empleadas alcanzan la magnitud micromolar, concentración elevada para estudios *in vitro* sobre receptores. La inhibición de la acción del isoproterenol en presencia del propranolol debe de ser interpretada en principio con reservas, ya que si bien podría ser consecuencia del

bloqueo de los posibles receptores β -adrenérgicos, también podría ser debida a la secreción de histamina inespecífica que estos fármacos producen en ciertos casos (9), y que podría justificar los elevados errores estándar obtenidos con estos datos.

Estos resultados son marcadamente distintos a los obtenidos en mastocitos de pulmón de rata, en donde no se aprecia actividad inhibitoria de tipo beta adrenérgico, lo cual de nuevo confirma la enorme diversidad farmacológica que presentan los mastocitos de distintos tejidos y especies. Es por tanto arriesgado intentar extrapolar información obtenida en mastocitos de una clase a otra población distinta, máxime si es de otra especie.

En resumen, los datos aportados apoyan inicialmente la posible existencia de actividad adrenérgica inhibitoria en mastocitos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente con proyectos del Rectorado de la Universidad de Santiago de Compostela y de la Xunta de Galicia (España).

Resumen

Los mastocitos aislados enzimáticamente a partir de pulmón y mucosa intestinal de perro constituyen un modelo celular no estudiado previamente. Se describe la respuesta de estas células al FNa-calcio, al compuesto 48/80, al ionóforo A23187 y a la concanavalina A. La respuesta inducida por A23187, la concanavalina A o el 48/80 se inhibe casi completamente con isoproterenol. La respuesta a la concanavalina A es intensa, lo que indica que el grado de sensibilización de los mastocitos intestinales es alto. Los resultados apoyan la existencia de actividad beta adrenérgica inhibitoria en ambos modelos celulares.

Palabras clave: Mastocitos mucosos, β -adrenérgico, Fluoruro sódico, Concanavalina A, Ionóforo A23187.

Bibliografía

1. Barret, K. E. y Metcalfe, D. D.: *J. Immunol.*, 135, 2020-2026, 1985.
2. Botana, L. M.: *Gen. Pharmacol.*, 18, 263-267, 1987.
3. Botana, L. M., Espinosa, J. y Eleno, N.: *Gen. Pharmacol.*, 18, 141-148, 1987.
4. Botana, L. M., Orallo, F., Espinosa, J. y Calleja, J. M.: *Gen. Pharmacol.*, 17, 615-618, 1986.
5. Ennis, M.: *Agent Actions*, 12, 60-63, 1982.
6. Ishizaka, T.: *Fed. Proc.*, 14, 17-21, 1982.
7. Jarret, E. E. E. y Haig, D. M.: *Immunol. Today*, 5, 115-119, 1984.
8. Maron, Z., Casale, T. B.: *Allergy*, 50, 367-370, 1983.
9. Nosal, R., Ondrias, K., Pecivova, J. y Drabikova, K.: *Agents Actions*, 23, 143-145, 1988.
10. Vieytes, M. R., Louzao, M. C., De la Cruz, L. F. y Botana, L. M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 47, 13-18, 1991.