

## Efecto del isoproterenol sobre la liberación de histamina en mastocitos de pulmón de rata

M. R. Vieytes, M. C. Louzao, L. F. de la Cruz y L. M. Botana\*<sup>1</sup>

Departamentos de Fisiología y de Farmacología<sup>1</sup>  
Facultad de Veterinaria  
E-27002 Lugo (España)

(Recibido el 30 de agosto de 1990)

M. R. VIEYTES, M. C. LOUZAO, L. F. DE LA CRUZ and L. M. BOTANA.  
*Effect of Isoproterenol on Histamine Release on Rat Lung Mast Cells.* Rev. esp. Fisiol., 47, (1), 13-18, 1991.

Rat lung mast cells were stimulated with drugs with distinct mechanisms of action, namely concanavalin A, compound 48/80 ionophore A23187, in the presence of the beta adrenergic agonist (-)isoproterenol. Cells show a high response when they are stimulated with FNa-calcium. Isoproterenol does not inhibit histamine release induced by any stimuli, but enhances the response to concavalin A and compound 48/80. Results point to the lack of beta activity on rat lung mast cells.

**Key words:** Mast cells,  $\text{cAMP}$ , Phosphodiesterase, Isoproterenol.

Los mastocitos son células de origen medular y de características similares a los basófilos, con precursores inmediatos distintos para ambos modelos celulares (2). La distribución de los mastocitos es muy amplia por todo el organismo, aunque son particularmente abundantes en las zonas perivascular y perilinfática, ya que estas células, junto con los basófilos, son las responsables de las reacciones alérgicas. Se desconoce el papel fisiológico de los mastocitos, pero en determinadas circunstan-

cias patológicas se les reconoce una función concreta e importante, como en la eliminación de infestaciones intestinales por helmintos, inflamación, asma, etc. (10). Desde el punto de vista histológico se agrupan en dos subtipos: los mastocitos conectivos, habitualmente empleados por su fácil obtención para el estudio de los mecanismos de la exocitosis y los mastocitos mucosos, que se ubican en las superficies mucosas del organismo, siendo particularmente abundantes en el intestino y en el pulmón (11). El comportamiento farmacológico de ambos subtipos celulares es muy distinto, por lo cual deben estudiarse separadamente. En general, la he-

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

terogeneidad de los mastocitos es un hecho que afecta, dentro de un mismo organismo, a las células de regiones anatómicas distintas. En nuestro laboratorio se estudian sistemáticamente como entidades farmacológicas separadas los mastocitos de pleura y peritoneo de rata. En el presente trabajo se inicia la tipificación de los mastocitos mucosos de varios tejidos y especies, comenzando por el pulmón de rata y centrándonos en la actividad adrenérgica, por ser un aspecto previamente tipificado en los mastocitos pleurales y peritoneales de rata (6). El fármaco adrenérgico empleado es el isoproterenol, que actúa sobre los distintos subtipos de receptores  $\beta$ , y como agentes estimulantes de la secreción empleamos cuatro fármacos con mecanismos de acción distintos, el fluoruro sódico, que sensibiliza la célula a la acción del calcio (7), el ionóforo A23187, que permeabiliza el calcio en la membrana, el compuesto 48/80 como prototipo de poliamina, y la concanavalina A, una lectina que se une a los azúcares constitutivos de la IgE (9).

### Material y Métodos

Los medios fisiológicos empleados para la manipulación de los mastocitos, así como la técnica para la determinación de liberación de histamina, han sido descritos previamente (3, 4). Brevemente, la histamina se hace reaccionar en un pH ácido con *o*-ftalaldehído, para formar un fluoróforo que se estabiliza al alcalinizar la solución; en todos los ensayos se incluyen controles de liberación espontánea, en ausencia de estímulo, y de histamina total contenida en las células. Las incubaciones en presencia de los estímulos se prolonga durante 10-15 min. Las preincubaciones de las células se realizan durante 10 min.

*Obtención de mastocitos de pulmón de rata.* — Se obtienen mediante dispersión enzimática con colagenasa, siguiendo la

técnica descrita por ENNIS (8). Se desangra el animal previamente anestesiado con éter, y se toman fragmentos pequeños de pulmón, que se lavan repetidas veces. El tejido se suspende en la proporción 7-10 g por 25 ml de solución Umbreit con 1 mg/ml de proteína (albúmina bovina), al que previamente se ha añadido colagenasa (12,5 mg/25 ml). Se incuba con agitación a 37 °C durante 90 minutos. Tras la incubación, se facilita la dispersión del tejido mediante succión varias veces con una jeringa de plástico. A continuación se filtra el tejido por una gasa previamente humedecida en solución 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 realizan en presencia de 10  $\mu$ g/ml de fosfatidilserina.

La viabilidad celular y la citotoxicidad de los fármacos empleados se determina mediante la técnica de exclusión del azul tripano (4).

Todos los reactivos empleados son de Sigma.

*Análisis estadístico de los resultados.* — Los datos son analizados con el test *t* de Student para datos apareados. Se consideran significativos los valores de  $p < 0,01$ . Los datos se obtienen como mínimo cuatro veces por duplicado o triplicado, y se representan como media y error estándar de la media (SEM). Se representan sólo los SEM superiores a 4.

### Resultados

La liberación de histamina producida por diferentes concentraciones de calcio en mastocitos activados con fluoruro sódico se muestra en la fig. 1. La respuesta comienza con 0,1 mM, se dispara con 0,5 y se alcanza la meseta con 5 mM. La respuesta de los mastocitos a la concanavalina A (Con-A) se muestra entre 0-250  $\mu$ g/ml,

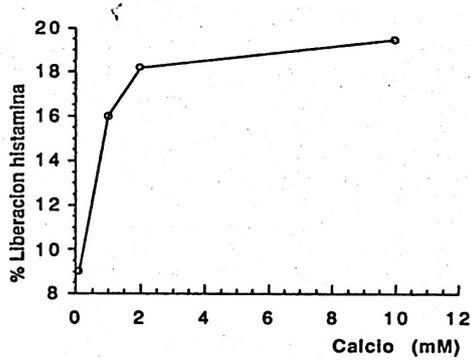


Fig. 1. Liberación de histamina en mastocitos de pulmón de rata preincubados durante 10 minutos en presencia de FNa 10 mM en un medio sin calcio, adicionando calcio e incubando posteriormente durante 10 minutos.

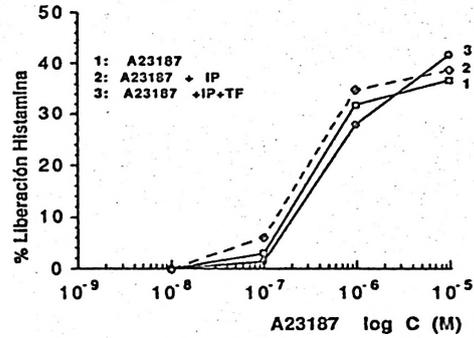


Fig. 3. Liberación de histamina en mastocitos de pulmón de rata estimulados con ionóforo A23187, preincubados con (-)isoproterenol (100  $\mu$ M) y preincubados con isoproterenol y una concentración subóptima de teofilina (10  $\mu$ M).

obteniéndose la respuesta máxima, del 20 %, con 50  $\mu$ g/ml. En cada tubo de células tratadas con Con-A se añaden 10  $\mu$ g/ml de fosfatidilserina, necesaria para que las células respondan a la Con-A. El tratamiento previo de las células con teofilina (TF) y con isoproterenol (IP) muestra un aplanamiento de la respuesta, que se mantiene estable en la concentración de Con-

A, en torno al 25-30 % de respuesta (figura 2).

La respuesta al ionóforo A23187 aparece entre 100 nM-10  $\mu$ M. La respuesta máxima es del 40 %. El perfil obtenido con el A23187 no se altera significativamente con tratamientos previos de las células con IP o TF (fig. 3). La dosis de teofilina empleada (10  $\mu$ M) es subóptima, es

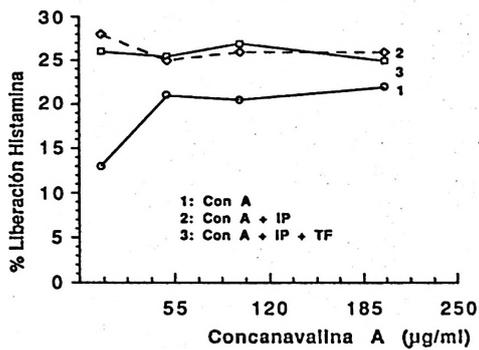


Fig. 2. Liberación de histamina en mastocitos de pulmón de rata estimulados con concanavalina A, preincubados con (-)isoproterenol (100  $\mu$ M) y preincubados con isoproterenol y una concentración subóptima de teofilina (10  $\mu$ M).

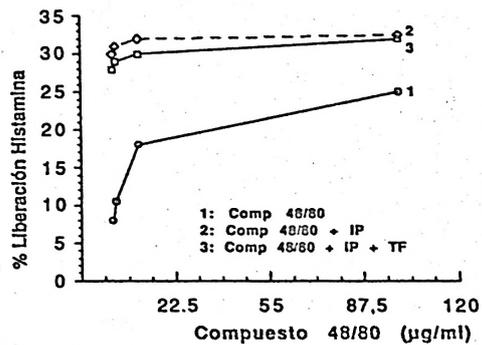


Fig. 4. Liberación de histamina en mastocitos de pulmón de rata estimulados con compuesto 48/80, preincubados con (-)isoproterenol (100  $\mu$ M) y preincubados con isoproterenol y una concentración subóptima de teofilina (10  $\mu$ M).

decir, no es suficiente para modificar por sí sola la respuesta de las células, pero potencia la acción de otros fármacos que actúen simultáneamente con ella (5). Cuando las células son incubadas en presencia de compuesto 48/80, la respuesta se manifiesta entre 1-100  $\mu\text{g/ml}$ , obteniéndose los valores máximos a partir de 20  $\mu\text{g/ml}$ . La preincubación de las células con IP o TF supone un incremento notable en los valores de liberación de histamina, obteniéndose la respuesta máxima entre 1-5  $\mu\text{g/ml}$  (fig. 4). El tratamiento con propranolol (hasta 100  $\mu\text{M}$ ) no anuló la respuesta de las células al isoproterenol (datos no mostrados).

### Discusión

En trabajos previos se ha descrito la existencia de actividad adrenérgica de los mastocitos pleurales y peritoneales de rata, mostrando que es distinta en ambas poblaciones celulares (3, 4). Al estudiar la actividad adrenérgica en mastocitos de pulmón de rata, se ha tratado de diversificar los mecanismos de acción de los estímulos empleados utilizando Con-A, que mimetiza la acción fisiológica de la IgE al unirse a sus azúcares constitutivos, para provocar la agregación de los receptores (9). El ionóforo emplea un mecanismo de acción distinto, que consiste en permeabilizar la membrana al calcio al rodear el ion de un entorno lipídico que le permite pasar al interior celular. El compuesto 48/80 es una poliamina que produce respuestas muy intensas en mastocitos conectivos, pero que tiene una acción muy tenue en mastocitos mucosos, como se confirma en este trabajo. Los mastocitos preincubados con FNa, y posteriormente estimulados con calcio liberan histamina según un mecanismo de acción desconocido, aunque está relacionado con la acción del FNa en la adenilato ciclasa (5) y en las proteínas G (7).

De la información aportada en este tra-

bajo, se puede concluir genéricamente que los mastocitos de pulmón de rata son tan activos como los conectivos frente al FNa, que responden mucho menos a la Con-A y al 48/80, y que la respuesta al ionóforo es intensa, aunque menor que la de los mastocitos pleurales o peritoneales. El hecho de que los mastocitos respondan intensamente al FNa apoya la existencia de mecanismos bioquímicos basados en el AMPc que regulen la respuesta celular, con lo cual se puede considerar como «instalado» el sistema de transducción de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Sin embargo, los datos obtenidos con Con-A, A23187 y 48/80 en presencia de IP no sustentan la existencia de actividad  $\beta$ -adrenérgica. De existir, la actividad adrenérgica descrita hasta el momento en mastocitos de todo tipo es inhibitoria (6). En nuestro caso, no se obtiene alteración de la respuesta al ionóforo, y sí un claro incremento en presencia de 48/80 y Con-A. La respuesta en presencia de teofilina, que es un inhibidor inespecífico de las fosfodiesterasas (1), y por tanto aumenta la concentración de AMPc, debería suponer un incremento de la respuesta al IP, que al actuar a través de receptores beta, aumenta la concentración de AMPc. Por tanto, cabe suponer que el incremento de respuesta observado con 48/80 y Con-A se deba a una acción inespecífica del IP, ya que la adición de la TF no modifica la respuesta previamente observada. Apoya esta suposición la falta de bloqueo de la respuesta con propranolol en las células tratadas con isoproterenol.

Existe una explicación alternativa, que podría justificar de algún modo el efecto observado con IP: en basófilos humanos se ha observado recientemente, que ciertos fármacos que aumentan la concentración de AMPc no sólo no inhiben la respuesta provocada por determinados estímulos, sino que la aumentan (BOTANA y MACGLASHAN, manuscrito en preparación). Sin embargo, esta hipótesis no dispone todavía de apoyo experimental suficiente.

Por tanto, podemos concluir que los mastocitos de pulmón de rata carecen de actividad beta adrenérgica inhibidora.

#### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Rectorado de la Universidad de Santiago, y por la Xunta de Galicia (España).

#### Resumen

Se describe la respuesta de mastocitos de pulmón de rata aislados enzimáticamente y estimulados con fármacos que emplean mecanismos de acción distintos, en presencia del agonista beta adrenérgico (-)isoproterenol. Los estímulos son el ionóforo A23187, la poliamina compuesto 48/80 y la lectina concanavalina A. La respuesta de estas células al estímulo FN-calcio es similar a la de los mastocitos conectivos. El isoproterenol no inhibe la respuesta en ningún caso, y la aumenta en el caso de la lectina y la poliamina. Los datos nos permiten concluir que los mastocitos de pulmón de rata no tiene actividad beta adrenérgica.

Palabras clave: Mastocitos, AMPc, Fosfodiesterasa, Isoproterenol.

#### Bibliografía

1. Beavo, J. A. y Reifsnyder, D. H.: *TIPS*, 128, 150-155, 1989.
2. Befus, A. D., Bienenstock, J. y Denburg, J. A.: *Mast cell differentiation and heterogeneity*, Raven Press, Nueva York, 1986.
3. Botana, L. M.: *Gen. Pharmacol.*, 18, 263-267, 1987.
4. Botana, L. M., Espinosa, J. y Eleno, N.: *Gen. Pharmacol.*, 18, 41-148, 1987.
5. Botana, L. M., Espinosa, J., Eleno, N., Botana, M. A. y Fernández-Otero, M. P.: *Rev. esp. Fisiol.*, 44, 105-106, 1988.
6. Botana, L. M., Orallo, F., Espinosa, J. y Calleja, J. M.: *Gen. Pharmacol.*, 17, 615-618, 1986.
7. English, D., Rizzo, M. T., Tricot, G. y Hoffman, R.: *J. Immunol.*, 143, 1685-1691, 1989.
8. Ennis, M.: *Agent Actions*, 12, 60-63, 1982.
9. Ishizaka, T.: *Fed. Proc.*, 14, 17-21, 1982.
10. Martín, T. W. y Lagunoff, D.: En "Cell Biology of the secretory process". (Cantin, M., ed.). Karger, Basilea, 1984, pp. 92-97.
11. Wasserman, S. I.: *Environ. Health Perspect.*, 55, 259-269, 1984.

