

## Inhibición específica por ATP de la secreción ácida estimulada por histamina en glándulas gástricas de conejo

C. E. Gil-Rodrigo, B. Gáldiz, M. Carou, J. M. Gandarias, R. Gómez, A. Vallejo y L. F. Ainz\*

Departamento de Fisiología  
Facultad de Medicina y Odontología  
Universidad del País Vasco (UPV-EHU)  
48080 Bilbao (España)

(Recibido el 18 de julio de 1991)

C. E. GIL-RODRIGO, B. GÁLDIZ, M. CAROU, J. M. GANDARIAS, R. GÓMEZ, A. VALLEJO and L. F. AINZ. *Specific Inhibition by ATP of the Histamine-Stimulated acid Secretion in Rabbit Gastric Glands*. Rev. esp. Fisiol., 48 (1), 31-36, 1992.

The influence of adenosine 5'-triphosphate on gastric acid secretion stimulated by histamine, carbachol, dibutyryl-cAMP and the phosphodiesterase inhibitors 8-phenyl-theophylline and rolipram in isolated rabbit gastric glands was studied. Changes on gastric acid secretion were measured by the aminopyrine accumulation method. Histamine-stimulated acid secretion was significantly inhibited by ATP 1 mM, whereas the secretory responses elicited by carbachol, dibutyryl-cAMP, 8-phenyl-theophylline or rolipram were not. Assays with indomethacin, a well known prostaglandin synthesis inhibitor, showed that this agent significantly reduced the inhibitory effect of ATP on histamine responses. The results indicate that the antisecretory effect of ATP was specific for histamine and that it was mediated, at least in part, via stimulation of endogenous prostaglandin production.

**Key words:** ATP, Secretagogues, Acid secretion, Rabbit gastric glands

La actividad desplegada por la adenosina 5'-trifosfato como efector extracelular en diversos sistemas fisiológicos es un hecho ampliamente reconocido (6). Muchas de las acciones del ATP son mediadas por

receptores purinérgicos específicos de tipo  $P_2$  (3, 6, 14). Se ha sugerido que, al menos en algunos casos, este tipo de purinoceptor  $P_2$  guarda relación con la producción de prostaglandinas (3, 6, 9). En contraste con la importante base bibliográfica sobre las acciones del ATP en los sistemas nervioso, cardiovascular, respiratorio, urogenital y en músculo liso gastrointestinal

\* A quien debe dirigirse la correspondencia.  
Abreviaturas: Carbacol (CBC), Dibutilil-AMPc (db-AMPc), 8-Fenil-teofilina (8FT), Fosfodiesterasa (PDE), Indometacina (IM), Aminopirina (AP).

(3, 6, 9), la información disponible acerca del efecto del ATP sobre la secreción gástrica del ácido resulta particularmente escasa y diversa; por ejemplo, se ha descrito que el aporte exógeno de ATP causa: inhibición de la secreción de ácido estimulada por histamina en preparaciones de mucosa gástrica de rana (8, 11), estimulación moderada de la secreción basal de ácido en estómago íntegro aislado de rata (4) y, también, que carece de efecto sobre la secreción de ácido estimulada por histamina en mucosa gástrica de cobaya (7). Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio (1, 5) muestran que el ATP es un notable inhibidor de la secreción de ácido estimulada por histamina en preparaciones de glándulas gástricas aisladas de conejo. Nuestros resultados y los obtenidos por KIDDER (8) y por SANDERS *et al.* (11) coinciden en señalar que el ATP actúa principalmente como inhibidor de la secreción gástrica de ácido estimulada por histamina.

En base a cuanto antecede, los objetivos del presente trabajo han sido: examinar la influencia del ATP sobre la secreción gástrica de ácido estimulada por histamina y por otros secretagogos como el carbachol, el dibutilil-AMPc, la 8-fenil-teofilina, agente antagonista de receptores de adenosina (purinoceptores  $P_1$ ) e inhibidor de fosfodiesterasa y el Rolipram —agente inhibidor específico de fosfodiesterasa—, y analizar la posible implicación de purinoceptores  $P_2$  vinculados a la producción de prostaglandinas, sustancias que inhiben la secreción gástrica de ácido, en el efecto inhibidor desplegado por el ATP sobre la secreción de ácido estimulada por histamina. A tal fin, se ha estudiado la influencia de la indometacina, conocido inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, sobre las respuestas desencadenadas por el ATP. Puesto que en la preparación de glándulas gástricas empleada las variaciones en la secreción de ácido no se pueden medir directamente, los cambios en la secreción se han evaluado indirectamente utilizando el

método de la acumulación de la base débil ( $^{14}\text{C}$ )-aminopirina (10).

### Material y Métodos

Se han empleado conejos de raza New Zealand, machos y hembras de 2,5 a 4 kg. Los animales, tenidos en condiciones ambientales adecuadas y con acceso libre a comida y bebida hasta el comienzo del experimento, se sacrificaron mediante dislocación cervical. La perfusión del estómago se realizó con la técnica descrita por BERGLINDH y OBRINK (2). Las soluciones tamponadas para la perfusión, la disgregación de las glándulas y la posterior incubación (medio respiratorio), así como el procedimiento general de experimentación, se llevaron a cabo de acuerdo con la descripción de SACK y SPENNEY (10). Las tasas de acumulación de AP correspondientes a los niveles de secreción de ácido obtenidos en cada caso se evaluaron en forma de relación entre AP atrapada en el interior de las glándulas y AP remanente en el medio respiratorio (Rap), es decir  $\text{Rap} = \text{AP intraglandular} / \text{AP medio (10)}$ :  $\text{Rap} = \text{pellet cpm} / (2 \mu\text{l/ml}) \cdot (\text{mg peso seco}) \cdot (\text{medio cpm}/\mu\text{l})$

Con el fin de normalizar los valores de secreción de  $\text{H}^+$ , la respuesta secretora o relación de AP (Rap) se expresa como cociente respecto de la secreción basal, es decir, en forma de tanto por uno respecto de la basal:

$$\text{CRap} = \text{Rap (agente)} / \text{Rap (basal)}$$

La viabilidad de las glándulas se comprobaba mediante tinción con *azul de trypan* y observación al microscopio antes y después de la incubación, obteniéndose rendimientos superiores al 90 %. Además del control microscópico se realizaba un control funcional de modo que en todos los lotes experimentales de glándulas obtenidas de animales diferentes se procedía a examinar la capacidad de respuesta secretora mediante elaboración de curvas concentración-respuesta al secretagogo

histamina [1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M], desechándose aquellas preparaciones glandulares que no respondieron a la histamina. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, el promedio de los tres valores obtenidos con cada muestra en un experimento fue considerado como dato único. Los resultados indican, por tanto, la media  $\pm$  e.s.m. de un número de datos (n) que se corresponde con el número de animales diferentes utilizados. El tratamiento estadístico de los datos se verificó empleando el parámetro t de Student para datos no apareados.

Se han utilizado: histamina, adenosina 5'-trifosfato e indometacina de Merck, carbacol, dibutiril-AMPc y 8 fenil-teofilina de Sigma. El Rolipram ha sido una aportación generosa de Schering, cuya gentileza agradecen los autores.

### Resultados

De los agentes empleados en el presente estudio, para estimular la secreción de ácido, el más efectivo es la histamina. El valor medio de la relación de acumulación de aminopirina (Rap) para la histamina 0,1 mM fue:  $129,7 \pm 3,12$  (n = 106), lo que supone un valor medio normalizado (CRap) de  $4,36 \pm 0,1$ . El CBC resultó netamente menos efectivo que la histamina siendo el valor de CRap, para CBC 0,1 mM, de  $2,25 \pm 0,33$  (n = 4). Este resultado concuerda con las descripciones previas para ambos secretagogos en preparaciones de glándulas y de células parietales de conejo (13). El valor medio de CRap obtenido con el inhibidor específico de PDE Rolipram 1  $\mu$ M fue de  $3,43 \pm 0,187$  (n = 38), mientras que con 8FT 10  $\mu$ M fue de  $1,98 \pm 0,16$  (n = 13) y con db-AMPc 0,1 mM,  $1,812 \pm 0,17$  (n = 6). El rolipram fue después de la histamina, el secretagogo más efectivo. Los resultados obtenidos al ensayar la influencia del ATP sobre la secreción glandular de ácido estimulada por cada uno de los secretatogos arriba refe-

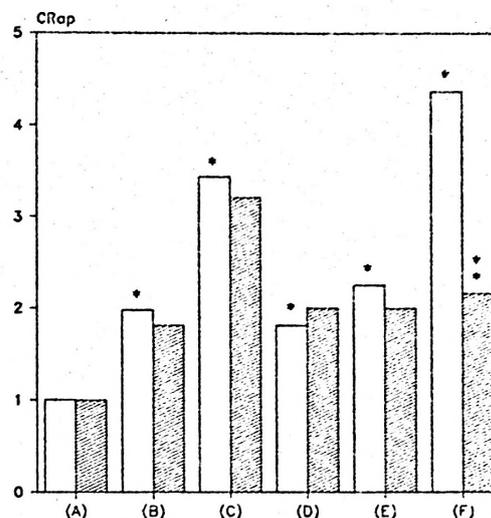


Fig. 1. Efecto del ATP 1 mM (columnas rayadas) sobre la secreción basal (A) y estimulada con 8-fenil-teofilina 10  $\mu$ M (B), Rolipram 1  $\mu$ M (C), dibutiril-AMPc 0,1 mM (D), carbacol 0,1 mM (E) e histamina 0,1 mM (F).

Las respuestas secretoras vienen expresadas como el cociente de la relación de acumulación de aminopirina o CRap = Rap agentes / Rap basal. La altura de las columnas es la media de al menos cuatro experimentos. \* p < 0,05 respecto a la secreción basal del ácido y \*\* p < 0,05 respecto a la secreción estimulada por el secretagogo correspondiente.

ridos se recogen en la figura 1. Como puede verse, el ATP 1 mM indujo una notable inhibición de la secreción estimulada por histamina 0,1 mM sin afectar significativamente la secreción estimulada por agentes distintos a la histamina.

En la serie experimental realizada para estudiar la posible implicación de purinoceptores P<sub>2</sub> vinculados con la producción de prostaglandinas en el efecto inhibidor del ATP sobre la secreción estimulada por histamina, se obtuvieron los siguientes resultados: la indometacina 1, 10 y 100  $\mu$ M, que no afectaba significativamente el nivel de secreción de ácido incrementado por histamina 0,1 mM, como indican los valores promedio de CRap ob-

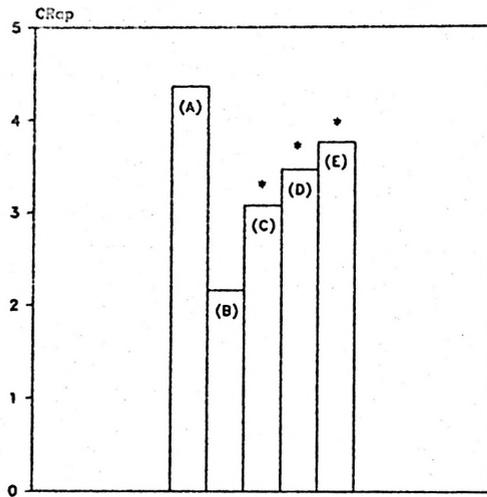


Fig. 2. Efecto de la indometacina 1  $\mu$ M (C), 10  $\mu$ M (D) y 100  $\mu$ M (E) sobre la inhibición por ATP 1 mM (B) de la respuesta secretora inducida por histamina 0,1 mM (A).

CRap, \*  $p < 0,05$  respecto al control histamina 0,1 mM + ATP 1 mM.

tenidos  $4,28 \pm 0,3$  ( $n = 21$ ),  $4,33 \pm 0,33$  ( $n = 21$ ) y  $4,66 \pm 0,35$  ( $n = 21$ ), respectivamente, causó una progresiva reducción dependiente de la concentración del efecto inhibidor de ATP 1 mM sobre histamina 0,1 mM que era significativa ( $p < 0,05$ ) para las tres concentraciones de IM utilizadas (fig. 2).

### Discusión

De acuerdo con lo consignado en estudios previos (1, 5, 8, 11), los resultados del presente trabajo confirman el notable efecto inhibitor del ATP sobre la secreción de ácido estimulada por histamina. El ATP, sin embargo, no modifica significativamente las respuestas secretoras inducidas por carbacol, db-AMPc, 8FT o rolipram, lo que indica que la acción inhibitor del ATP resulta específica para la histamina.

La ausencia de efecto del ATP sobre la secreción glandular de ácido estimulada por carbacol sugiere que ambos agentes ejercen su influencia sobre la secreción de ácido a través de mecanismos celulares diferentes. La falta de efecto del ATP sobre las respuestas secretoras inducidas por el AMPc en forma de su derivado más liposoluble, db-AMPc, y por agentes como 8FT o rolipram, que elevan el contenido celular de AMPc vía inhibición de fosfodiesterasa, es indicativa de que el efecto antsecretor del ATP resulta de la interferencia específica a nivel de alguna de las etapas del mecanismo de acción de la histamina previas a la formación de AMPc.

La observación de que ciertos agentes inhibidores de la secreción gástrica de ácido como las prostaglandinas estimulan la producción de AMPc en preparaciones de mucosa gástrica aislada (13) ha limitado la aceptación de la existencia de un vínculo entre el aumento de la producción de AMPc y la estimulación de la secreción de ácido. Sin embargo, en estudios de separación celular se ha establecido que ese incremento de AMPc en respuesta a prostaglandinas en concentraciones de orden micromolar guarda relación con las fracciones que contienen células no-parietales y no con las fracciones ricas en células parietales (13). Por su parte, los resultados descritos en preparaciones de glándulas gástricas y de células parietales aisladas coinciden en señalar que el efecto gastrosecretor de la histamina tiene lugar a través de receptores  $H_2$  vía activación de la adenilato ciclasa y consiguiente elevación del AMPc (13). Estos trabajos han supuesto un importante apoyo experimental en favor de la estrecha relación existente, en este tipo de preparaciones, entre la producción de AMPc y la estimulación de la secreción gástrica de ácido por histamina (13).

Se ha descrito que las prostaglandinas  $E_2$ ,  $I_2$ ,  $F2\alpha$ ,  $D_2$  y ciertos derivados análogos estables, en concentraciones nanomolar (fisiológicas), inhiben por acción

directa la función secretora de las células parietales estimulada por histamina (12, 13). Este efecto, al menos en conejo, es mediado por un receptor de prostaglandinas localizado en la membrana parietal (12). La acción antisecretora de las prostaglandinas es, al parecer, específica para la histamina puesto que no afectan las respuestas estimuladas por carbacol, gastrina o db-AMPc (13). Asimismo, existen pruebas indicativas de que las prostaglandinas, en el rango de concentración nanomolar en el que inhiben la secreción estimulada por histamina, inhiben también el aumento de producción de AMPc inducido por histamina (13). De acuerdo con esto y en base a evidencias experimentales se ha sugerido que la interacción inhibidora de las prostaglandinas sobre la histamina tiene lugar a nivel de la adenilato ciclasa a través del siguiente mecanismo: la ocupación de receptores H<sub>2</sub> por histamina conduce a la activación de la adenilato ciclasa mediante la proteína G<sub>s</sub> o transductor de membrana de carácter estimulador; por su parte, las prostaglandinas actúan vía proteína G<sub>i</sub> o transductor de membrana de carácter inhibidor descendiendo la actividad de la adenilato ciclasa y atenuando de ese modo la producción de AMPc y la secreción gástrica de ácido estimulada por histamina (13).

Dado que, como puede apreciarse, el comportamiento antisecretor aquí referido para el ATP se asemeja con el previamente descrito para las prostaglandinas, cabe pensar que el mecanismo de la acción inhibidora del ATP guarda relación con el sugerido para prostaglandinas (13). A este respecto, cabe considerar dos posibilidades: que el ATP actúa directamente sobre la célula parietal vía purinoceptor P<sub>2</sub> y proteína G<sub>i</sub> inhibiendo a la adenilato ciclasa y atenuando la respuesta secretora inducida por histamina, y que, el ATP actuando sobre la propia célula parietal o sobre células no parietales vecinas vía purinoceptores P<sub>2</sub> vinculados a la síntesis de prostaglandinas estimula su producción

endógena y éstas, a través del mecanismo ya referido, inhiben la respuesta secretora a la histamina.

Aunque ambas posibilidades permitirían explicar los resultados comentados al comienzo de la discusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo en los ensayos realizados con indometacina, conocido inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, muestran que la indometacina reduce significativamente el efecto inhibidor del ATP sobre la secreción glandular de ácido estimulada por histamina lo que apoya un mecanismo de acción para el ATP del tipo descrito como segunda posibilidad.

En definitiva, nuestros resultados indican que el ATP inhibe específicamente la secreción de ácido estimulada por histamina en glándulas gástricas aisladas de conejo y que dicho efecto antisecretor es, al menos en parte, consecuencia de la estimulación inducida por ATP sobre la producción endógena de prostaglandinas presumiblemente mediada por purinoceptores P<sub>2</sub>.

### Resumen

Se estudia la influencia del ATP sobre la secreción de ácido estimulada por histamina, carbacol, dibutilil-AMPc, 8-fenil-teofilina y rolipram en glándulas gástricas aisladas de conejo, evaluando los cambios en la secreción de H<sup>+</sup> mediante el método de acumulación de aminopirina. El ATP 1 mM inhibe significativamente la secreción de ácido estimulada por histamina pero no modifica significativamente las respuestas secretoras inducidas por carbacol, dibutilil-AMPc o por inhibidores de fosfodiesterasa como 8-fenil-teofilina o rolipram. La indometacina, conocido inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, reduce significativamente la acción inhibidora del ATP sobre la histamina. Estos resultados indican que el ATP inhibe específicamente la secreción de ácido estimulada por histamina en glándulas gástricas aisladas de conejo y que el efecto antisecretor

del ATP tiene lugar, al menos en parte, vía estimulación de la producción endógena de prostaglandinas.

Palabras clave: ATP, Secretagogos, Secreción ácida, Glándulas gástricas de conejo.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado con fondos del programa de Proyectos de Investigación de la Universidad del País Vasco (UPV-EHU).

#### Bibliografía

1. Ainz, L. F., Gil-Rodrigo, C. E., Gómez, R., Malillos, M., Requejo, D. y Gandarias, J. M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 45, 281-286, 1989.
2. Berglindh, TH. y Obrink, K. J.: *Acta Physiol. Scand.*, 96, 150-159, 1976.
3. Burnstock, G. y Buckley, N. J.: En «Methods in Pharmacology» (Paton, D. M., ed.), Plenum Publishing Corp., Londres, 1985. Vol. 6, pp. 193-212.
4. Gandarias, J. M., Ainz, L. F., Gil-Rodrigo, C. E., Goiriena, J. J., Gómez, R. y Martínez, I.: *Rev. esp. Fisiol.*, 41, 83-88, 1985.
5. Gil-Rodrigo, C. E., Gáldiz, B., Gandarias, J. M., Gómez, R. y Ainz, L. F.: *Pharmacol. Res.*, 22, 103-113, 1990.
6. Gordon, G. L.: *Biochem. J.*, 233, 309-319, 1986.
7. Heldsinger, A. A., Vinik, A. I. y Fox, I. H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237, 351-356, 1986.
8. Kidder, G. W.: *Am. J. Physiol.*, 221, 421-426, 1971.
9. Olsson, R. A. y Pearson, J. D.: *Pharmacol. Rev.*, 70, 761-845, 1990.
10. Sack, J. y Spenney, J. G.: *Am. J. Physiol.*, 243, G313-G319, 1982.
11. Sanders, S. S., Butler, C. F., O'Callaghan, J. y Rehm, W. S.: *Am. J. Physiol.*, 230, 1688-1694, 1976.
12. Seidler, U., Beinborn, M. y Sweing, K.-F.: *Gastroenterology.*, 96, 314-320, 1989.
13. Soll, A. H. y Berglindh, T.: En «Physiology of the Gastrointestinal Tract» (2.ª edic.) (Johnson, L. R., ed.), Raven Press, Nueva York, 1987, pp. 883-909.
14. Williams, M.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 27, 315-345, 1987.