

## Respuesta de las poblaciones pleural y peritoneal de mastocitos de rata ante agentes con distintos mecanismos de acción

L. M. Botana\*, J. Espinosa y M.ª P. Fernández-Otero\*\*

Departamento de Fisiología Animal  
Facultad de Farmacia  
Santiago de Compostela

(Recibido el 7 de octubre de 1985)

L. M. BOTANA, J. ESPINOSA and M. P. FERNANDEZ-OTERO. *Response of Pleural and Peritoneal Mast Cells Treated with Agents of Distinct Action Mechanisms*. Rev. esp. Fisiol., 42 (4), 449-454, 1986.

Histamine release from rat pleural and peritoneal mast cells not previously purified is presented. Cells are stimulated by different mechanism-acting pharmacologic agents. FNa, theophylline, ruthenium red, chlorpromazine and propranolol are used. Results show that both cell populations are pharmacologically different, with distinct responses in the presence of FNa or chlorpromazine. Chlorpromazine and propranolol are cytolytic agents.

**Key words:** Mast cell heterogeneity. Propranolol, Chlorpromazine, Sodium fluoride, Theophylline, Ruthenium red.

Los mastocitos son células de tejido conectivo que se emplean como modelo biológico para el estudio de la exocitosis. Participan en las reacciones de hipersensibilidad inmediata, y su respuesta se

caracteriza por ser extremadamente rápida y de naturaleza explosiva, es decir, la célula queda muy dañada como consecuencia de la expulsión de los gránulos que posee, necesitando varias semanas para su total regeneración (9, 12). Si bien la respuesta de estas células es semejante en todas las zonas anatómicas, el perfil farmacológico de las diferentes poblaciones mastocitarias no lo es (15, 16). En el presente trabajo se describen las diferencias que muestran las poblaciones de mastocitos de las cavidades pleural y peritoneal

\* A quien debe dirigirse la correspondencia: Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago, 27002 Lugo.

\*\* Dirección actual: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, 31080 Pamplona.

frente a distintos tipos de estímulos secretores.

### Material y Métodos

**Aislamiento de mastocitos.** Los mastocitos son aislados de las cavidades torácica y peritoneal de ratas Wistar (300-500 g) de ambos sexos, siguiendo un método descrito previamente (6). La suspensión celular obtenida se concentra mediante centrifugación a 50 g y, posteriormente, se elimina el sobrenadante, que es sustituido por nuevo medio. Este proceso de lavado se repite dos veces, centrifugando en ambos casos a 50 g.

**Incubación.** Se realizan a 37°C durante 10 min, omitiendo la fase de preincubación excepto en el caso del FNa, en que se preincuba durante 10 min en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$ , y se incuban otros 10 en su presencia, actuando de esta forma el calcio como estímulo de secreción. Cuando se emplean propranolol o rojo de rutenio se determina la histamina sólo en el pellet. Para ello la incubación se frena añadiendo a los tubos 5 ml de PBS (solución salina-tamponada, pH 7) a 0°C. Se centrifuga a 400 g durante 3 min y se elimina el sobrenadante, procesando el pellet como se indica en un trabajo previo (5). En este caso el cálculo del porcentaje de secreción es como sigue:  $\% R = ((C - S)/C) \times 100$ , siendo C = histamina en los pellet de los controles de liberación espontánea, y S = histamina en las muestras. Para el cálculo de la liberación espontánea, C = contenido de histamina de los controles de histamina total, y S = histamina en los pellet de los controles de liberación espontánea.

**Determinación de histamina.** Se realiza fluorimétricamente según una modificación del método original (6).

**Viabilidad celular.** Se comprueba empleando el test del azul tripano (6), y en todos los casos es superior al 95 %; este valor se refiere a la viabilidad de los mastocitos, si bien los demás tipos celulares presentan

una viabilidad semejante. Del total de células obtenidas tras el lavado de las cavidades, el porcentaje de mastocitos constituye un 6-10 %; dado que se obtienen aproximadamente  $1 \times 10^6$  mastocitos de la cavidad peritoneal y  $5 \times 10^5$  mastocitos de la cavidad pleural, el número de ratas utilizado en cada experimento se modificó para realizar incubaciones con aproximadamente 25.000 mastocitos por tubo.

**Ensayo de citotoxicidad.** Se considera que una sustancia es citotóxica si induce muerte celular, es decir, si no excluye el azul tripano. Para ello el test se hace en células que han sido expuestas durante 10 min a la acción de la sustancia a estudiar. El estudio de citotoxicidad se realiza sólo en mastocitos, sin tener en cuenta los demás tipos celulares.

Todos los experimentos se realizan 4 veces, y en ningún caso el SEM es superior al 5 %. El análisis estadístico de los resultados se hace empleando el test t-Student ( $p < 0,05$ ) para datos desapareados. Todos los reactivos se obtienen de Sigma.

### Resultados

**Fluoruro sódico.** La respuesta inducida por el calcio en mastocitos previamente tratados con FNa 10 mM se presenta en la figura 1. Hasta 1 mM de  $\text{Ca}^{++}$  ambas poblaciones, peritoneal y torácica, presentan el mismo comportamiento. Con concentraciones mayores hay una clara separación de respuestas, mostrando porcentajes mayores la población peritoneal. La respuesta es bastante intensa (en ambos casos se supera el 60 % para 10 mM) y la meseta de la curva se obtiene con calcio 10 mM.

**Teofilina.** Inhibe la secreción de histamina. Como estímulo de secreción se emplea el compuesto 48/80 (0,25 µg/ml), que induce una respuesta en los controles de  $50 \pm 3$  y  $51,2 \pm 4$  en peritoneo y tórax respectivamente. El comportamiento de

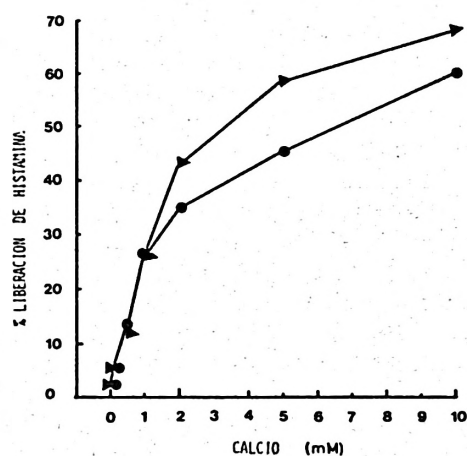


Fig. 1. Liberación de histamina en mastocitos pleurales (▲) y peritoneales (●) estimulados con varias concentraciones de calcio tras su activación con FNa 10 mM durante 10 min en ausencia de calcio.

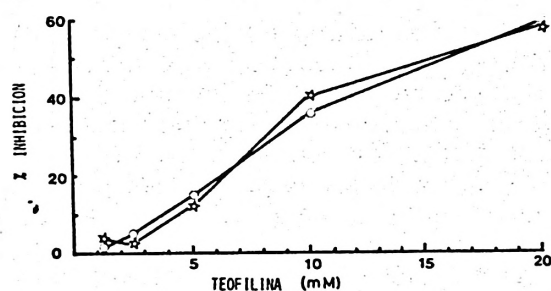


Fig. 2. Inhibición de la liberación de histamina en mastocitos pleurales (★) y peritoneales (○) estimulados con compuesto 48/80 (0,25 µg/ml) por la teofilina.

las dos poblaciones no difiere significativamente con ninguna concentración empleada. El efecto inhibitor se muestra a partir de 50 mM. La máxima inhibición se alcanza con 20 mM (fig. 2).

**Rojo de rutenio.** Estimula la secreción de histamina en poca cuantía. La respuesta es similar en las dos poblaciones, y comienza a detectarse con 5 µg/ml de rojo de rutenio. La respuesta máxima se obtiene con 20 µg/ml (fig. 3).

**Clorpromazina.** Provoca una secreción marcadamente más intensa en la población torácica, tanto en sensibilidad como en respuesta máxima. La meseta se alcanza con 50 µM y en todos los casos se observa captación del azul tripano, lo cual indica que la acción es citotóxica (fig. 4).

**Propranolol.** Da lugar a una respuesta muy intensa que se manifiesta súbitamente con concentraciones superiores a 100 µM. La respuesta máxima se obtiene con 500

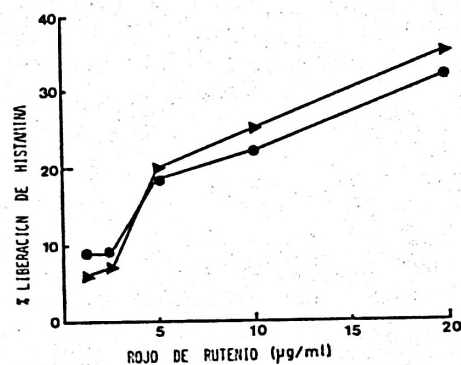


Fig. 3. Liberación de histamina en mastocitos pleurales (▲) y peritoneales (●) inducida por el rojo de rutenio.

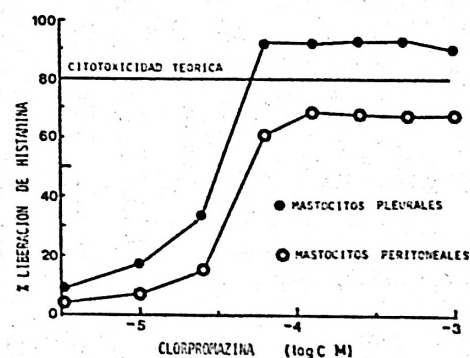


Fig. 4. Liberación de histamina inducida por la clorpromazina.

La línea de citotoxicidad teórica corresponde a la propuesta por JOHNSON y MORAN (10). Las concentraciones empleadas son (µM): 5, 10, 20, 50, 100, 250 y 1.000.

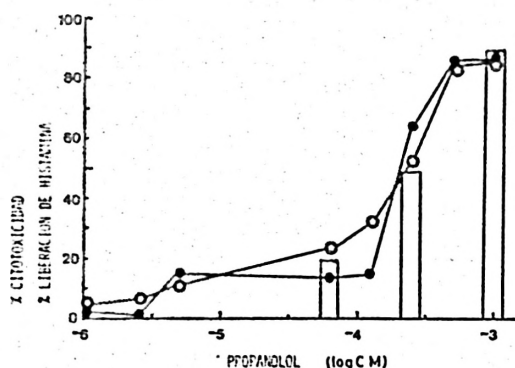


Fig. 5. Liberación de histamina inducida por propranolol (líneas) en mastocitos pleurales (○) y peritoneales (●), y porcentaje de citotoxicidad (barras) en las células.

Las concentraciones empleadas son (μM): 1, 2, 5, 5, 10, 50, 100, 125, 250, 500, 1.00.

μM, que proporciona valores cercanos al 90 % de secreción de histamina. El comportamiento de las dos poblaciones celulares es semejante para todas las concentraciones, y las células muestran una total correlación entre citotoxicidad y secreción de histamina (fig. 5).

### Discusión

El hecho de que los mastocitos de diferentes regiones anatómicas tengan características distintas ha sido descrito por varios autores (2). Respecto a la heterogeneidad celular, se ha descrito que las poblaciones pleural y peritoneal presentan distinta sensibilidad al cambio de respuesta que induce la purificación a través de distintos medios, al menos cuando el estímulo de secreción es una poliamina (2). Previamente otros autores (3, 4) habían mostrado la diferente respuesta que las dos poblaciones presentan ante distintos estímulos o agentes inhibidores, concluyendo que son poblaciones farmacológicamente distintas. En el presente trabajo se estudia el comportamiento de los mastocitos de las cavidades peritoneal y pleural

ante estímulos nuevos, algunos de ellos no descritos. De la observación global de los resultados, puede concluirse que la población torácica es, en general, más activa que la peritoneal, concordando estos datos con los publicados anteriormente para otros estímulos (5). El FNa estimula la adenilato ciclase (14), por lo que la distinta respuesta de los mastocitos peritoneales o pleurales al ser estimulados con calcio (14) podría indicar que esta enzima presenta actividades distintas en las dos poblaciones celulares. Cabe pensar que la población pleural tiene flujos de calcio distintos respecto a la población peritoneal, pero esto no concuerda con los resultados presentados en la figura 2; si bien la teofilina actúa inhibiendo la fosfodiesterasa (11), en los mastocitos inhibe también los flujos de calcio (8), y el comportamiento de las dos poblaciones de mastocitos con ese inhibidor es semejante.

El rojo de rutenio, inhibidor de la calcio ATPasa (17), induce una secreción de histamina semejante en las dos poblaciones, hecho comprobado estudiando la actividad ATPasa de los mastocitos.

Tanto la clorpromazina como el propranolol liberan histamina debido a su acción citotóxica. La respuesta a la clorpromazina, inhibidor de la calmodulina (7), es distinta para los mastocitos de las dos poblaciones. Es destacable asimismo que la citotoxicidad en el caso de la población peritoneal se presenta a concentraciones inferiores que el límite de citotoxicidad indicado por JOHNSON y MORAN (10). Por último, cabe señalar que el perfil de dosis-respuesta obtenido con propranolol, antagonista β-adrenérgico (1), no ha sido descrito previamente (1, 13).

### Resumen

Se describe la respuesta que los mastocitos (no purificados) de tórax y de peritoneo presentan ante agentes farmacológicos con distintos mecanismos de acción. Se emplean el fluoruro sódico, la teofilina,

rojo de rutenio, la clorpromazina y el propranolol. Los resultados muestran que las dos poblaciones son entidades farmacológicamente distintas, y presentan respuestas distintas en presencia de FNa y clorpromazina. La clorpromazina y el propranolol actúan mediante un proceso citolítico.

### Bibliografía

1. Alm, P. E.: Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Umea, Suecia, 1982.
2. Barret, K. E., Metcalfe, D. D.: *J. Clin. Immunol.*, **4**, 253-261, 1984.
3. Barret, K. E., Pearce, F. L.: *Agents and Actions*, **12**, 186-188, 1982.
4. Batchelor, K. W., Stanworth, D. R.: *Immunology*, **41**, 271-278, 1980.
5. Botana, L. M., Espinosa, J., Eleno, N., Segura, C., Fernández-Otero, M. P.: *Agents and Actions*, **16**, 342-345, 1985.
6. Botana, L. M., Espinosa, J., Fernández-Otero, M. P.: *Rev. esp. Fisiol.*, **39**, 435-440, 1983.
7. Douglas, W. W., Nemeth, E. F.: *J. Physiol.*, **323**, 229-244, 1982.
8. Fewtrell, C. M. S., Gomperts, B. D.: *Nature*, **265**, 635-639, 1977.
9. Foreman, J. C.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **21**, 63-81, 1981.
10. Johnson, A. R., Morán, N. C.: *Fed. Proc.*, **28**, 1716-1720, 1969.
11. Lichtenstein, L. M., Margolis, S.: *Science*, **161**, 902-903, 1968.
12. Martin, T. W., Lagunoff, D.: En «Cell Biology of the Secretory Process» (Mantlin, M., ed.). S. Karger, Basilea, 1984, pp. 481-516.
13. Nosal, R., Menyhardtová, Z.: *Agents and Actions*, **7**, 231-236, 1977.
14. Paktar, S. A., Kazimierczak, W., Diamant, B.: *Int. Archs. All. Appl. Immunol.*, **57**, 146-154, 1978.
15. Pearce, F. L.: *TIPS*, **4**, 165-167, 1984.
16. Saavedra-Delgado, A. M. P., Turpin, S., Metcalfe, D. D.: *Agents and Actions*, **14**, 1-7, 1984.
17. Watson, E. L., Vicenzi, F. F., Davis, P. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 606-610, 1971.

