

Efecto de la colchicina sobre la secreción de histamina y captación de calcio en mastocitos

N. Eleno*, L. Botana, J. Espinosa, M. P. Fernández-Otero**

Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia
Santiago de Compostela (España)

(Recibido el 9 de abril de 1987)

N. ELENO, L. BOTANA, J. ESPINOSA and M. P. FERNANDEZ-OTERO. *Effect of Colchicine on Histamine Release and Calcium Uptake in Mast Cells*. Rev. esp. Fisiol., 44 (1), 35-40, 1988.

The function of contractil system of microtubules on the mechanism of mast cell exocytosis by using colchicine, a depolymerizing alcaloid of the microtubular system, has been studied. The response of histamine release and ^{45}Ca -uptake in isolated rat mast cells treated with colchicine has been determined. The incubation of mast cells in the presence of 10^{-8} – 10^{-3} M colchicine slightly inhibits histamine secretion induced by the stimulant concentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of compound 48/80 ($35 \pm 5\%$). Similarly colchicine does not significantly affect histamine values spontaneously elicited in unstimulated mast cells; the percentages of secretion are never greater than 10%. However, high doses of this alcaloid are found to markedly inhibit entry of calcium ions into the cell. These results suggest that microtubules do not participate in the secretory process of mast cells, although they significantly decrease calcium uptake. The microtubules might be connected to the membrane, so that the depolymerization of this contractil system could damage the membrane structures through which Ca^{+2} is transported.

Key words: Mast cell, Histamine release, ^{45}Ca -uptake, Colchicine.

Los mastocitos son células secretoras del tejido conjuntivo que liberan sus mediadores quimiotácticos y vasoactivos en procesos patológicos relacionados con el sistema inmune. Intervienen en los procesos de hipersensibilidad inmediata (15), inflamación local (9) e hipersensibilidad retardada (1). Sin embargo, la función fisiológica que realizan estas células en el organismo sano continúa siendo un

enigma (14). También se desconocen los mecanismos fisiológicos que modulan la exocitosis, así como la secuencia exacta de procesos bioquímicos intracelulares que ocurren en el citoplasma después de la activación inmunológica (mediada por la IgE) o no inmunológica de los mastocitos (12).

Uno de los órganos celulares menos estudiado en el mastocito es el citoesqueleto ya que la densidad del citoplasma y la abundancia de gránulos impide observarlo con claridad. Estudios recientes revelan que esta formado por microtúbulos —polímeros de α y β -tubulina— que

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

** Dirección actual: Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra, 31080 Pamplona (España).

emergen desde el núcleo a la periferia, y una red de filamentos de actina dispuestos irregularmente en la región subplasmática (13).

El citoesqueleto participa en numerosos procesos celulares: mantenimiento del perfil y forma de la célula, transporte intracelular, movimiento y adhesión (17). Numerosos estudios revelan que el tratamiento de células secretoras con colchicina y otros agentes que disgregan los microtúbulos inhibe la liberación de hormonas y neurotransmisores (7). Sin embargo, se desconoce su participación en el proceso de exocitosis de numerosos sistemas celulares (6), entre ellos los mastocitos (3).

En este trabajo se estudia la acción de la colchicina en dos procesos fundamentales que tienen lugar durante la activación celular de los mastocitos: secreción de histamina y captación de calcio (Ca^{45}). Los resultados obtenidos aportan datos interesantes sobre la función de los microtúbulos en la exocitosis de los mastocitos.

Material y Métodos

Aislamiento y purificación celular. — Los mastocitos se aíslan de las cavidades pleural y peritoneal de ratas viejas (300-500 g) Sprague-Dawley, machos y hembras, indistintamente. Los animales se sacrifican por desangrado y, posteriormente, se introducen 12-15 ó 5-7 ml de solución salina Umbreit ligeramente modificada (4) en las cavidad abdominal y pleural, respectivamente. Tras un breve masaje se recoge el fluido mediante pipetas Pasteur de plástico y se decanta en tubos de centrifugación evitando la formación de burbujas. Seguidamente se centrifuga a $50 g_{\text{máx}} \times 2 \text{ min}$ (centrífuga Kontron TGA-6) a 4°C . Así se obtiene una suspensión de células que contiene 4-6 % de mastocitos.

Para la purificación celular se emplea la técnica ENERBÄCK para suspensiones ce-

lulares con un bajo grado de contaminación en eritrocitos (5). Cada tubo de purificación admite la carga máxima de células obtenida a partir de una rata. El rendimiento del proceso es de $1-1,5 \times 10^6$ mastocitos peritoneales y $3-5 \times 10^5$ mastocitos pleurales de cada animal con un grado de pureza de 98 %.

En todos los pasos se emplea material plástico para impedir la adhesión de los mastocitos al vidrio.

Test de viabilidad. — La viabilidad celular se determina por el test de exclusión del azul de Tripiano. Las células vivas excluyen el colorante en un tiempo inferior a 3 min.

Incubación in vitro de los mastocitos. — Los tubos problema se preparan del siguiente modo: se coloca una carga $1-1,5 \times 10^5$ mastocitos que se incuban en presencia del agente farmacológico de tratamiento (colchicina) durante 1 h a 37°C . El volumen final es 1 ml. En los ensayos de inhibición de la secreción por colchicina, las células se preincuban durante 1 h en presencia del alcaloide siendo el volumen final $975 \mu\text{l}$. Posteriormente se adiciona una alícuota ($25 \mu\text{l}$) de una solución concentrada del agente estimulante (compuesto 48/80) prolongando la incubación durante 10 min.

La incubación se realiza con una agitación de 160 ciclos/min en un baño New Brunswick mod. G-76. La reacción se frena adicionando 5 ml de tampón a 0°C a los tubos problema sumergidos en un baño de hielo.

Determinación fluorimétrica de histamina. — Después de frenar la reacción se centrifugan los tubos a $60 g_{\text{máx}} \times 2 \text{ min}$. Se desecha el sobrenadante y únicamente se determina la histamina contenida en el residuo celular puesto que la colchicina emite fluorescencia a la misma longitud de onda que el fluoróforo de histamina (fig. 1). Por ello se emplea una variante

del método de SHORE (16) que mide la histamina liberada en función de la histamina del residuo celular (% Secreción = $(C-S)/Cx100$), donde C = histamina medida en los tubos control; S = histamina medida en los tubos problema.

Los controles representan la liberación espontánea de histamina en mastocitos no sometidos a tratamiento con el agente farmacológico. Estos valores son del 4-6 % y se restan en todos los tubos problema.

Captación de Ca^{45} . — Antes de comenzar los ensayos se preparan disoluciones acuosas del isótopo radiactivo de modo que la actividad total teórica incluida en cada tubo problema sea de 5×10^5 dpm (AT).

La incubación se realiza en tubos de polipropileno cilíndricos (tubos Akes, 500 μ l) provistos de un lecho de aceite en el fondo (100 μ l, $d = 1,02$). Los mastocitos ($330 \pm 25 \times 10^5$ células/tubo) se adicionan en una alícuota de 200 μ l de tampón desprovisto de proteína y se preincuban 20 min a 37° C. Posteriormente se adiciona la colchicina junto con una alícuota de 100 μ l de Ca^{45} . Los mastocitos se incuban en este medio durante 60 min. Finalmente se frena la reacción por centrifugación a 10.000 rpm $\times$ 30 s en una microfuga Beckman, mod. 11; los mastocitos atraviesan la capa de aceite y se depositan en el fondo de los tubos que se congelan rápidamente a -25° C. Al cabo de 2 h se cortan los fondos y se transfieren a viales de centelleo de vidrio. Tras una fuerte agitación en presencia de NaOH 0,1 N las células rompen liberando el Ca^{45} captado. Se adicionan 4 ml de líquido de centelleo y se dejan reposar los viales durante 2 h en la oscuridad para disminuir el efecto de quimioluminiscencia. Finalmente se procede a la lectura en un contador de radiación beta Beckman, mod. LS-3801 con una eficiencia de conteo del 95 %.

El efecto de *quenching* es mínimo y se

desechan los tubos en los que aparece doble fase en el líquido de centelleo. En todos los tubos se resta el ruido de fondo debido a la radiactividad natural (74 ± 8 cpm).

En cada experimento se incluyen dos tipos de controles: 1) controles que miden el ligamento inespecífico (NSB) producido por los componentes del medio de incubación; 2) controles que determinan el Ca^{45} ligado a la superficie externa de la membrana y el Ca^{45} arrastrado en los espacios intercelulares durante la centrifugación (EB).

Los resultados se expresan en porcentaje del incremento de la captación de calcio en mastocitos sometidos al tratamiento con colchicina (U) respecto a la captación en células no tratadas (C) (% Captación = $(U-C)/Cx100$). Los valores negativos indican la aparición de un efecto inhibitorio.

Análisis estadístico de los resultados. — La significación estadística de la diferencia entre medias se determina mediante el test de la *t* de Student para muestras desapareadas. Se consideran significativos valores de $p < 0,05$.

Previamente se confirma que las muestras proceden de poblaciones con la misma varianza por el test de la *F* de Snédecor.

Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Los tubos problema se incluyen por triplicado y el número de veces que se repite una experiencia (*n*) se indica en cada caso.

Reactivos. — Colchicina, albúmina bovina sérica (fracción V) y compuesto 48/80 fueron obtenidos de Sigma. O-ftaldehído (OPT) y aceite de inmersión, de Merck. Percoll, de Pharmacia Fine Chem. Ca^{45} (2 mCi/ml) de Amersham y líquido de centelleo Ready-Solv HP de Beckman Instruments (España). Todos los demás reactivos son de grado analítico.

Resultados

La colchicina produce interferencias en el método de Shore ya que emite fluorescencia a la misma longitud de onda que el fluoróforo OPT-histamina. La interferencia aparece con la concentración de colchicina 0,1 mM y alcanza el $98 \pm 2\%$ con 1 mM (fig. 1). Los valores indican el incremento que se produce sobre la fluorescencia emitida por un control de histamina 50 μ M ($50,5 \pm 0,5$ unidades arbitrarias de fluorescencia o U.A.F.) Debido a estas interferencias se elimina el sobrenadante y sólo se mide la histamina del residuo celular —histamina no liberada por los mastocitos.

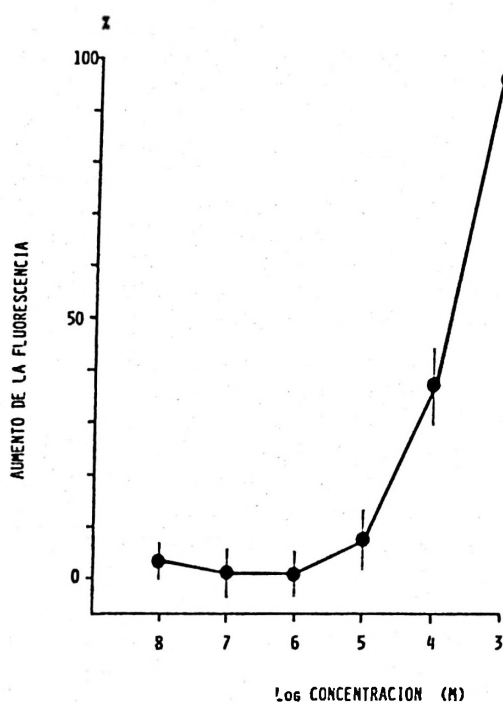


Fig. 1. Interferencia producida por la colchicina (10^{-8} - 10^{-3} M) sobre la fluorescencia emitida por la histamina.

En ordenadas, el porcentaje de aumento de la fluorescencia respecto al control de histamina 50 μ M ($50,5 \pm 0,5$ U.A.F.). Media $\pm$ SEM para $n = 3$.

El tratamiento con colchicina (10^{-8} - 10^{-3} M) provoca una respuesta secretora en los mastocitos que no supera los valores de liberación basal de histamina (10 %) (fig. 2). Sin embargo, en mastocitos previamente tratados con dosis bajas de colchicina y posteriormente activados con compuesto 48/80 (50 μ g/ml), se detecta una ligera inhibición de la secreción: colchicina 1 μ M inhibe $11 \pm 3\%$, mientras que concentraciones de 1 μ M-1 mM no ejercen ningún efecto potenciador ni inhibidor sobre la secreción inducida por

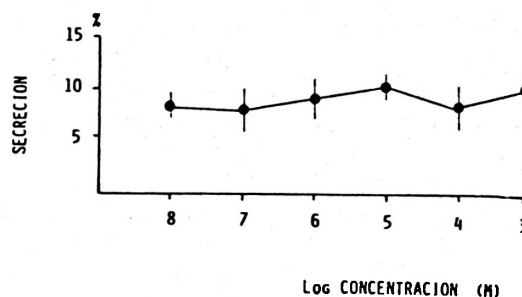


Fig. 2. Respuesta secretora de los mastocitos incubados 60 min con colchicina (10^{-8} - 10^{-3} M). Media $\pm$ SEM para $n = 3$.

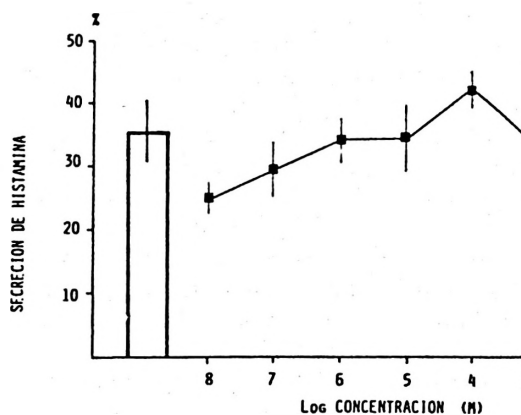


Fig. 3. Efecto de la colchicina sobre la secreción de histamina inducida por el compuesto 48/80.

Los mastocitos se preincubaban con colchicina durante 60 min; posteriormente se adiciona durante 48/80 prolongando la incubación 10 min más. Control de respuesta del compuesto 48/80, 50 μ g/ml ($\square$): $35 \pm 5\%$. Media $\pm$ SEM para $n = 3$.

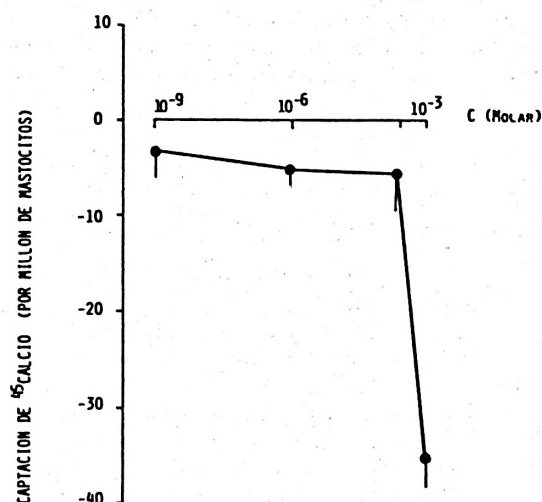


Fig. 4. Captación de Ca^{45} en mastocitos incubados durante 60 min en presencia de colchicina (10^{-8} - 10^{-3} M).

Los resultados se expresan como porcentaje de la captación de calcio en presencia de colchicina (U) respecto a la captación en células no tratadas con colchicina (C). Valor de los controles: % C/AT = 3,2; % EB/AT = 0,5. Media $\pm$ SEM para $n = 5$.

el compuesto 48/80 (fig. 3). El compuesto 48/80 provoca una estimulación de la secreción del 35 ± 5 %.

Es interesante destacar la inhibición que producen altas concentraciones de colchicina sobre la entrada de calcio en la célula. La máxima concentración (10^{-3} M) provoca un $35,5 \pm 3$ % de inhibición sobre la captación de Ca^{45} en células no estimuladas. Dosis menores producen una ligera inhibición comprendida entre 4-7 % (fig. 4).

Discusión

LACY *et al.* propusieron por primera vez la participación del sistema contráctil celular en la función secretora de las células beta en islotes de Langerhans (10). Desde entonces han aparecido numerosos trabajos que describen la inhibición de la

secreción de hormonas y neurotransmisores que se produce en células endocrinas y exocrinas tras el tratamiento con colchicina y otros agentes disgregantes de los microtúbulos; por el contrario, el óxido de deuterio (D_2O) —agente estabilizante de los microtúbulos— favorece la exocitosis (8). Sin embargo, no todos los resultados experimentales están de acuerdo en afirmar esta función generalizada de los microtúbulos en la secreción.

En mastocitos aparecen resultados contradictorios. Algunos autores observan que los mastocitos actúan como los leucocitos humanos cuya secreción es inhibida por colchicina y potenciada por D_2O (6, 7). Sin embargo, se trata de un efecto indirecto de la colchicina sobre la estabilización previa inducida por el deuterio; además, se requieren concentraciones excesivamente elevadas de ambos agentes (8). Por tanto, no se puede concluir que la inhibición de la secreción sea debida a la desintegración del sistema microtubular de la célula (3).

En este trabajo se ha encontrado que el tratamiento con colchicina a concentraciones entre 10^{-8} - 10^{-3} M no varía la liberación espontánea de histamina (fig. 2) ni ejerce ningún efecto sobre la secreción de histamina inducida por el compuesto 48/80 (fig. 3). Únicamente se observa una ligera inhibición con dosis de colchicina inferiores a 10^{-6} M, pero en ningún caso resulta significativa. Por tanto, la incubación con colchicina no afecta la secreción de histamina y los microtúbulos no constituyen un elemento esencial para la exocitosis en mastocitos. Previamente, las experiencias de Lagunoff y Chi muestran que mastocitos expuestos durante 4 horas a un tratamiento con colchicina, retienen un 80 % su capacidad de respuesta (11).

Sin embargo, es interesante destacar que la colchicina inhibe la entrada de Ca^{45} en la célula alcanzando porcentajes de inhibición significativos a altas concentraciones (10^{-3} M) (fig. 4). Esto sugiere la posibilidad de que exista una conexión

entre el citoesqueleto y la superficie celular de modo que la integridad de los microtúbulos sea un requisito para mantener la funcionalidad de los sistemas de membrana a través de los cuales se realiza el transporte de Ca^{++} (canales, poros).

Las concentraciones de colchicina que inhiben la captación de calcio en mastocitos (fig. 4), no ejercen efecto inhibitorio sobre la secreción inducida por el compuesto 48/80 (fig. 3). Estos resultados confirman la hipótesis de que el compuesto 48/80 estimula la secreción de histamina por un proceso dependiente del calcio interno, aunque se requiere la presencia de Ca^{++} 1 mM en el medio de incubación para que aparezca una respuesta óptima (2). Por tanto, se confirma que el compuesto 48/80 produce una depleción de las reservas de calcio endógeno para conseguir la elevación en los niveles de Ca^{+2} intracelular necesaria para la exocitosis. Sin embargo, los sistemas de transporte del Ca^{++} externo cuya funcionalidad es inhibida por la colchicina, no son utilizados por los mastocitos estimulados con el compuesto 48/80.

Resumen

Se estudia la función del sistema de microtúbulos sobre el mecanismo de exocitosis de los mastocitos, mediante la secreción de histamina y captación de Ca^{+5} en mastocitos purificados sometidos a un tratamiento con colchicina. La incubación de las células en presencia de colchicina (10^{-8} - 10^{-3} M) provoca una ligera inhibición —no significativa— sobre la secreción de histamina inducida por una concentración 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de compuesto 48/80 ($35 \pm 5\%$). Tampoco se detecta un aumento de los valores de liberación espontánea de histamina en mastocitos sometidos al tratamiento con colchicina; los porcentajes de secreción no superan el 10 %. Altas concentraciones inhiben marcadamente la entrada de calcio en la célula. Los resultados sugieren que los microtúbulos no participan en el mecanismo de exocitosis de los mastocitos pero sí afectan la entrada de calcio. Es probable que exista una conexión entre el

citoesqueleto y la membrana de modo que la despolimerización de los microtúbulos altere las estructuras de la membrana a través de las cuales se realiza el transporte de calcio.

Palabras clave: Mastocitos, Histamina, Captación de Ca, Colchicina.

Bibliografía

1. Askenase, P. W. y Loveren, H. V.: *Immunol Today*, 4, 259-264, 1983.
2. Cochrane, D. E., Distel, D. L., Lansman, J. B. y Paterson, B. M.: *J. Physiol.*, 323, 423-435, 1982.
3. Douglas, W. W. y Kagayama, M.: *J. Physiol.*, 270, 691-703, 1977.
4. Eleno, N., Botana, L., Segura, C. y Espinosa, J.: *Agents and Actions*, 22, 1-8, 1987.
5. Enerbäck, L. y Svensson, I.: *J. Immunol. Meth.*, 39, 135-145, 1980.
6. Gillespie, E. Levine, R. J. y Malawista, S. E.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 164, 158-165, 1968.
7. Gillespie, E. y Lichtenstein, L. H.: *J. Clin. Invest.*, 31, 2941-2947, 1972.
8. Gillespie, E. y Lichtenstein, L. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140, 1228-1230, 1972.
9. Kaliner, M. y Lemanske, R.: *Fed. Proc.*, 43, 2856-2851, 1984.
10. Lacy, P. E., Howell, S. L., Young, D. A. y Finck, C. J.: *Nature (Lond)*, 219, 1177-1179, 1968.
11. Lagunoff, D. y Chi, E. Y.: *J. Cell Biol.*, 71, 182-195, 1976.
12. Martin, T. W. y Lagunoff, D.: En «Cell Biology of the secretory process (Cantin, M., ed.). S. Karger, Basilea, 1984, pp. 481-516.
13. Nielsen, E. H. y Jhan, H.: *Virchows Arch.*, 45, 313-323, 1984.
14. Parwaresch, M. R., Horny, H. P. y Lennert, K.: *Path. Res. Pract.*, 179, 439-461, 1985.
15. Schleimer, R. P., Fox, C. C., Naclerio, R. M., Plaut, M., Creticos, P. S., Togias, A. G., Warner, J. A., Kagey-Sobotka, A. y Lichtenstein, L. M.: *J. All. Clin. Immunol.*, 76, 369-374, 1985.
16. Shore, P. A.: *Meth. Enzimol.*, 17, 842-845, 1971.
17. Weber, K. y Osborn, M.: *Invest. Sci.*, 111, 76-89, 1985.