

## Estudio de la actividad secretora de mastocitos en presencia de agonistas colinérgicos

J. Espinosa, L. M. Botana y M.<sup>ª</sup> P. Fernández-Otero

Departamento de Fisiología Animal  
Facultad de Farmacia  
Santiago de Compostela (Spain)

(Recibido el 27 de abril de 1983)

J. ESPINOSA, L. M. BOTANA and M.<sup>ª</sup> P. FERNANDEZ-OTERO. *Secretory Activity of Mast Cells in Presence of Cholinergic Stimulus*. Rev. esp., Fisiol., 39, 441-446, 1983.

Mast cells from rat peritoneal fluid were studied under cholinergic stimulus. The cells were purified by a continuous Ficoll gradient and were challenged with acetylcholine and carbamylcholine. The preparations showed the typical dose-response pattern against compound 48/80 with a dose interval of 0.5-1  $\mu$ M that clearly increased the secretion. However, the histamine release elicited by increasing concentrations of acetylcholine and carbamylcholine was of little magnitude and similar for all the concentrations; this kind of response has not a dose-response profile and does not appear to be explained by the presence of a cholinergic receptor on the mast cell cellular membranes.

The cholinergic agents neither stimulated directly the mast cells nor did they cause any variation in the 48/80 response. The histamine release pattern obtained with these agents cannot support the hypothesis of a primary cholinergic receptor on mast cells. However, if such receptor existed, its action could only be of secondary importance, and in fact such action was not manifested with the compound 48/80.

Los mastocitos son unidades exocrinas libres que responden a estímulos específicos con la liberación de mediadores pre y neoformados. Su respuesta es provocada por la interacción del agente estimulante con las células, posiblemente a través de receptores de los cuales se conoce el receptor para la molécula de IgE (4, 5, 7, 8). Sin embargo, es posible que el mastocito disponga de una dotación más rica de clases y tipos de receptores que lo hagan blanco de otras sustancias presentes en el organismo, así como de sustancias de tra-

tamiento destinadas a controlar e inhibir su secreción. En este sentido, se considera de interés estudiar sistemáticamente dicha posible dotación de receptores, siendo el estudio del receptor colinérgico el motivo de este trabajo.

### Material y métodos

*Reactivos.* O-ftaldehído (OPT), albúmina sérica de bovino y fracción V (BSA), los cloruros de histamina, acetil-

colina y carbamicolina, y el compuesto 48/80 proceden de Sigma. El Ficoll 400 procede de Pharmacia. El resto de los reactivos utilizados son de grado analítico.

**Purificación de mastocitos.** Para cada experimento se utilizan 8-10 ratas tipo Wistar, machos y hembras, con peso comprendido entre 250-350 g y alimentadas *ad libitum*. Las suspensiones de mastocitos se obtienen de la cavidad peritoneal y se purifican en gradientes de Ficoll según método ya descrito (2). Se admiten como válidas una pureza del 95 % y una viabilidad superior al 98 %. Este último porcentaje se determina utilizando el test de exclusión de azul tripano (2). La liberación espontánea es inferior al 8 %.

Alicuotas de  $10^5$  células se incuban en un medio Krebs-Ringer bicarbonato (2), a pH 7,4 y con atmósfera de 95 %  $O_2$ : 5 %  $CO_2$ . Se incuban a 37°C durante 20 min y con agitación. Las sustancias de tratamiento se adicionan a dicho medio, siendo el volumen final de 1 ml. El tipo de sustancias que se usan, así como las concentraciones empleadas, se indican en el apartado de resultados y en las leyendas de las gráficas correspondientes. La incubación se detiene introduciendo los tubos en baño de hielo durante 10 minutos.

La determinación de histamina y los cálculos correspondientes se realizan según ya se ha descrito (2). La secreción de histamina se expresa como porcentaje de la histamina total, haciendo las correcciones oportunas debido a la liberación espontánea.

El análisis de la diferencia significativa entre medias se realiza mediante el test t-Student para datos desapareados.

## Resultados y discusión

**Respuesta al tratamiento con compuesto 48/80.** La preparación de mastocitos reproduce la ya típica gráfica de sa-

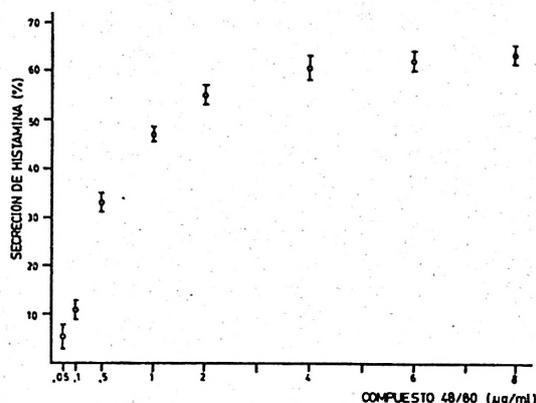


Fig. 1. Respuesta de los mastocitos al tratamiento con 48/80.

Se indica la  $\bar{x} \pm SEM$  para  $n = 6$ .

turación en experiencias dosis-respuesta (fig. 1), siendo las concentraciones de 0,5 y 1  $\mu g/ml$  las que disparan la secreción.

**Respuesta al tratamiento con acetilcolina.** Los resultados obtenidos (fig. 2), indican que no hay modificación alguna en la respuesta de los mastocitos al ser tratados con concentraciones crecientes de acetilcolina. Si se utiliza el compuesto 48/80 como marcador de la capacidad real de respuesta de los mastocitos (fig. 3), se observa que una misma preparación genera una curva dosis-respuesta para el compuesto 48/80 y no manifiesta un comportamiento semejante frente a la acetilcolina, sino que su respuesta es baja y uniforme frente a todas las concentraciones del agente colinérgico, habiéndose empleado un rango que cubre el intervalo femto-milimolar.

A la vista de estos resultados se diseñan experimentos agrupados eligiendo tres niveles de concentración de acetilcolina (pico, nano y micromolar), las cuales se ensayan aisladamente y con la adición simultánea de 48/80 (1  $\mu M$ ). Aún cuando el nivel de respuesta frente a la acetilcolina es bajo, sí se observan pequeñas dife-

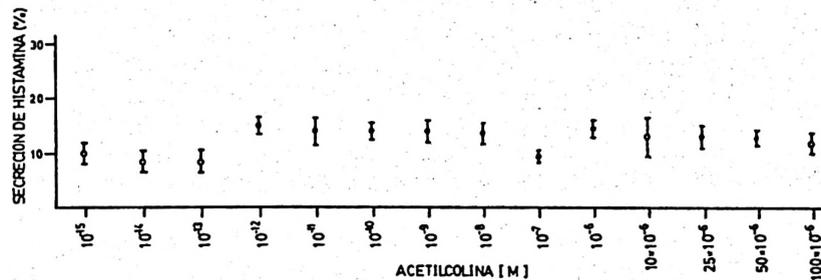


Fig. 2. Secreción de histamina por los mastocitos en presencia de concentraciones crecientes de acetilcolina.

Se indica la  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  para  $n = 6$ .

rencias significativas entre dichos niveles de concentración comparadas entre sí (fig. 4). No obstante, los valores obtenidos concuerdan con las respuestas indicadas en la figura 3 y la pequeña diferencia significativa observada no se corresponde en magnitud con los incrementos de la dosis.

Al tratar simultáneamente los mastocitos con las concentraciones de acetilcolina elegidas, y con compuesto 48/80 (1

$\mu\text{M}$ ), se observa que ninguna de las concentraciones modifica significativamente la respuesta del mastocito al compuesto 48/80 (fig. 4). Sin embargo, sí hay una ligera diferencia significativa en la respuesta a los tratamientos con Ach 1 pM y 1 nM, ambos con adición simultánea de compuesto 48/80.

*Respuesta al tratamiento con carbamilcolina.* Se ensayó un rango de con-

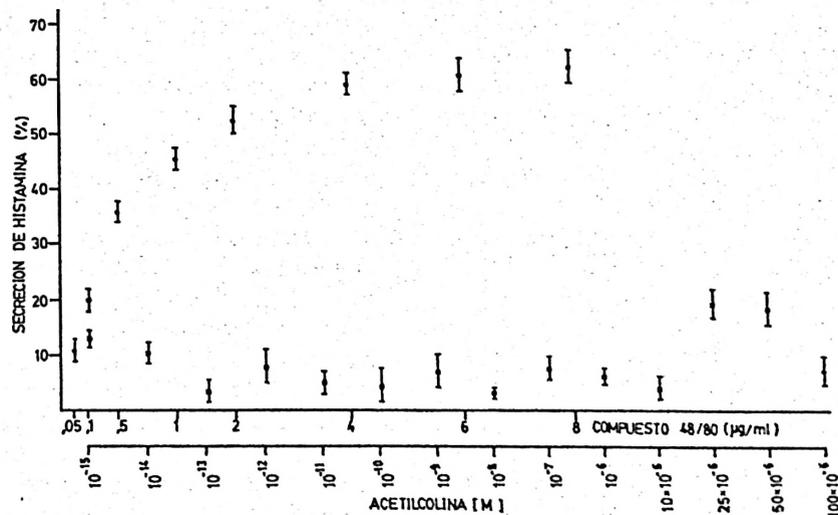


Fig. 3. Prueba comparativa de la respuesta de una misma preparación de mastocitos al tratamiento con acetilcolina (o) y con compuesto 48/80 (●).

Los tratamientos se hicieron a alícuotas distintas de una misma extracción de células. Se indica la  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  para  $n = 4$  en cada caso.

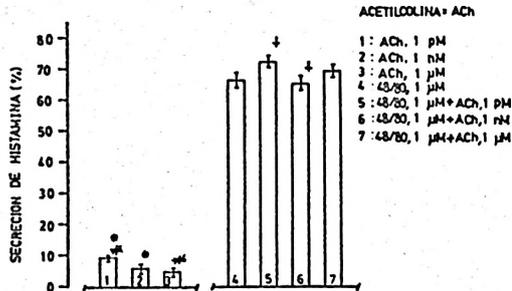


Fig. 4. Secreción de histamina en respuesta al tratamiento con acetilcolina, con 48/80, y con 48/80 más acetilcolina.

Los resultados se expresan como  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  para  $n = 8$  en cada grupo experimental. \*: diferencia significativa entre los grupos 1 y 2, para  $p < 0,05$ . †: diferencia significativa entre los grupos 1 y 3, para  $p < 0,01$ . ‡: diferencia significativa entre los grupos 5 y 6, para  $p < 0,05$ .

centraciones que cubren el intervalo 1 nM - 50 mM. Los resultados manifiestan un patrón de respuesta de los mastocitos frente a la carbamilcolina que es análogo al que tienen frente a la acetilcolina (fig. 5). La secreción de histamina se mantiene en niveles bajos y uniformes aunque se incrementen las concentraciones del agonista.

Los resultados obtenidos no apoyan la existencia de receptor colinérgico. Se utilizan concentraciones de agonistas que cubren el rango fisiológico y, tanto frente a acetilcolina como carbamilcolina, se obtiene un nivel bajo de respuesta no de-

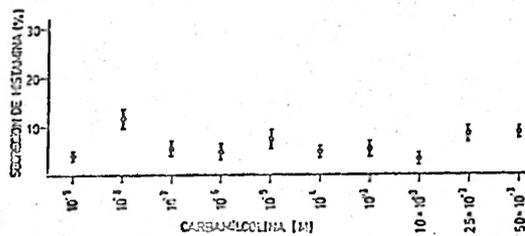


Fig. 5. Secreción de histamina en respuesta al tratamiento con carbamilcolina. Se indica la  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  para  $n = 6$ .

pendiente de concentración. Este comportamiento difiere marcadamente del que presentan estas células frente al compuesto 48/80 (3, 11, 12) y frente a las moléculas de IgE (4, 10): en ambos casos el comportamiento es dosis-respuesta, aunque sólo se conozca receptor para la IgE. La ausencia de un comportamiento semejante excluye un modelo de receptor, así como una posible respuesta —no mediada a través de receptores— como ocurre con el 48/80. Más bien se trata de un caso de respuesta inespecífica, débil e independiente de la concentración. Por otra parte, el estímulo colinérgico no presenta actividad cuando se ofrece a los mastocitos simultáneamente con 48/80.

De lo expuesto, se puede concluir que la ausencia de respuesta de los mastocitos ante acetilcolina y carbamilcolina hace difícil la presencia de un receptor colinérgico, cuya mediación estimule directamente la secreción de histamina, de modo que los agonistas colinérgicos puedan ser considerados como estimulantes primarios del mastocito. Esta opinión contradice la manifestada por otros autores (1, 6).

La hipótesis de un posible agonismo colinérgico con estimulación secundaria, potenciando la acción de un estimulante primario no se comprueba al menos para el compuesto 48/80, a pesar de haberse indicado que los agonistas colinérgicos pueden potenciar la secreción inducida por antígeno, haciéndolo a través del GMP-cíclico (9).

En cuanto a las diferencias significativas que surgen en los tratamientos con acetilcolina, y con compuesto 48/80 más acetilcolina, no se corresponden en absoluto con los incrementos de dosis aplicados, siendo más bien imputables a la variabilidad de la respuesta inespecífica que se encuentra frente a agonistas colinérgicos.

Finalmente, queda la posibilidad de que si existe receptor colinérgico, su actividad sea inhibitoria. Sin embargo, esta

afirmación no se ve apoyada por los resultados obtenidos en el tratamiento simultáneo con 48/80 y agonistas colinérgicos.

### Resumen

Se estudian los mastocitos procedentes de fluido peritoneal de rata en presencia de agentes colinérgicos. Las células se purifican utilizando un gradiente continuo de Ficoll y se incuban con acetilcolina y carbamilcolina. Las preparaciones muestran el ya conocido comportamiento dosis-respuesta frente al compuesto 48/80, con un intervalo de dosis de 0,5-1  $\mu$ M que claramente incrementa la secreción. Sin embargo, la secreción de histamina inducida por concentraciones crecientes de acetilcolina y carbamilcolina es de pequeña magnitud y similar para todas las concentraciones. Este tipo de respuesta no tiene un perfil dosis-respuesta y no parece explicable por la presencia de un receptor colinérgico en la membrana de los mastocitos.

Los agentes colinérgicos no estimulan directamente a los mastocitos, ni causan ninguna variación a su respuesta ante el compuesto 48/80. El patrón de secreción de histamina obtenido con estas sustancias no apoya la hipótesis de un receptor colinérgico primario en los mastocitos. Sin embargo, si tal receptor existe, su acción podría ser de tipo secundario, aunque frente al compuesto 48/80 tal acción no se ha manifestado.

### Bibliografía

1. BLANDINA, P., FANTOZZI, R., MANNAIONI, P. F. y MASINI, E.: *J. Physiol.*, 301, 281-293, 1980.
2. BOTANA, L. M., ESPINOSA, J. y FERNÁNDEZ-OTERO, M.<sup>a</sup> P.: *Rev. esp. Fisiol.*, 39, 78-83, 1983.
3. COCKCROFF, S., GOMPERS, B. D.: *Biochem. J.*, 178, 681-687, 1979.
4. CONRAD, D. H., BAZIN, H., SEHAN, A. H., FROESE, A.: *J. Immunol.*, 114, 1688-1691, 1975.
5. CONRAD, D. H., FROESE, A.: *J. Immunol.*, 116, 319-326, 1976.
6. FANTOZZI, R., MASINI, E., BLANDINA, P., MANNAIONI, P. F., BANI-SACCHI, T.: *Nature*, 273, 473-474, 1978.
7. FOREMAN, J. C.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21, 63-81, 1981.
8. FOREMAN, J. C.: En «Towards Understanding Receptors» (Lamble, J. W., ed.), Elsevier North-Holland Inc., Nueva York, 1981, pp. 217-222.
9. KALINER, M., ORANGE, R. P., AUSTEN, K. F.: *J. Exp. Med.*, 136, 556-567, 1972.
10. MENDOZA, G. R., METZGER, H.: *J. Immunol.*, 117, 1573-1578, 1976.
11. SULLIVAN, T. J., PARKER, K. L., EISEN, S. A., PARKER, Ch. W.: *J. Immunol.*, 114, 1480-1485, 1975.
12. THON, I. L., UVNÄS, B.: *Acta Physiol. Scand.*, 71, 303-315, 1967.

