

¿Participa la Histamina Mastocitaria en el reflejo periférico que modula la actividad simpática en la Rata?

M Salazar-Rodríguez¹, G Porras¹, E Villarroel¹, F Toro¹ y HA Campos¹.

1. Laboratorio de Neuroquímica Funcional. Cátedra de Farmacología. Escuela de Medicina José María Vargas, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

RESUMEN

Estudios previos realizados por Campos y colaboradores han demostrado la presencia de un reflejo periférico que modula inhibitoriamente la actividad simpática en el conducto deferente de la rata. Una modulación inhibitoria similar fue encontrada en el corazón del perro. En este reflejo periférico de asa corta parece estar involucrada una interacción entre neuronas noradrenérgicas y neuronas que contienen histamina, en el cual la histamina neuronal parece estar modulando la actividad simpática y la presión arterial de una manera inhibitoria. En este sentido, intervenciones quirúrgicas de la vía neuronal que contiene histamina, la cual es adyacente a los nervios simpáticos del conducto deferente de la rata, causan una facilitación local de la actividad simpática.

Además, Campos y colaboradores demostraron también un incremento de la actividad de la L-histidina descarboxilasa, marcador de la neurona que contiene histamina, por estimulación de la vía simpática, e inhibición de la enzima causó una facilitación de la actividad simpática e hipertensión arterial en la rata, sugiriendo la existencia de un mecanismo generalizado modulador de la actividad simpática. Condiciones estresantes que aumentan la actividad simpática incrementan los niveles sanguíneos de histamina en la rata y en humanos, por lo que se piensa que concomitantemente con la descarga simpática hay una liberación de histamina neuronal periférica como fenómeno reflejo compensador.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, en este trabajo se procedió a explorar si hay participación de la histamina mastocitaria en el reflejo periférico de autorregulación de la actividad simpática.

Para ello, ratas machos Sprague-Dawley recibieron 0.75 mg/kg, i.p. del compuesto 48/80, diariamente por 12 días; tratamiento que produce una marcada desgranulación mastocitaria. Se determinó la presión arterial media y la frecuencia cardiaca usando un plestimógrafo de cola, encontrándose que los parámetros cardiovasculares no cambiaron ni en el curso ni al final de la desgranulación con el compuesto 48/80. De estos estudios se desprende que la histamina mastocitaria tiene un papel secundario en la regulación funcional de la actividad simpática.

Palabras Clave: Histamina neuronal y mastocitaria, Reflejo periférico, Actividad simpática.

ABSTRACT

Earlier studies have shown the existence of a novel peripheral reflex, which down regulates sympathetic activity in the rat vas deferens. A similar inhibitory modulation was found in the dog heart. It appears that, as a rule, the sympathetic discharge interacts with histamine-containing neurons in the periphery. Neuronal histamine seems to be inhibitorily modulating noradrenaline release from sympathetic nerve terminals, thus damping down sympathetic activity and arterial pressure. Along these lines, enhancement of sympathetic activity is accompanied by an increase of L- histidine decarboxilase activity, and inhibition of neuronal histamine biosynthesis causes facilitation of sympathetic activity and arterial hypertension. All the evidence suggests that histamine is reflexly released when sympathetic activity is enhanced. Within this context, we studied the possible participation of mast cell histamine in the peripheral reflex of sympathetic autoregulation.

The effects of chronic mast cell degranulation with 48/80, 0.75 mg/Kg i.p. daily for 12 days, on cardiovascular parameters were studied. Mean arterial pressure and heart rate did not change during the course or at the end of treatment with 48/80, which suggests that mast cell histamine is not involved in the functional regulation of sympathetic activity and arterial pressure.

Key Words: Neuronal and mast cell histamine, Peripheral reflex, Sympathetic activity.

INTRODUCCIÓN

Campos y col. (1988, 1992, 1995, 1996, 1998) demostraron la presencia de un reflejo periférico que modula inhibitoriamente la actividad simpática en el conducto deferente de la rata. En este reflejo participan tres neuronas, la noradrenérgica, la sensorial peptidérgica y la neurona histaminérgica.

La descarga simpática puede excitar la aferente sensorial primaria cuyo cuerpo celular neuronal está localizado en el ganglio simpático ipsolateral. La vía nerviosa sensorial puede cruzar y llevar el mensaje a la neurona que contiene histamina (HA) del ganglio simpático contralateral cuya vía nerviosa viaja en dirección contraria para inervar el conducto deferente donde la actividad simpática está aumentada (Campos, 1988; Campos y Briceño, 1992; Campos y Domínguez, 1995, Campos y col, 1998). Así, la HA liberada de la neurona histaminérgica puede inhibir la liberación de noradrenalina (NA) del terminal nervioso simpático a través del receptor inhibitorio H₃ (Acuña y col, 1998).

En este orden de ideas, la HA neuronal parece ser liberada reflejamente como un fenómeno compensatorio durante la actividad simpática aumentada en el conducto deferente (Campos y Domínguez, 1995; Campos y Montenegro, 1998). Estos hallazgos sugieren la presencia de una interacción generalizada entre neuronas noradrenérgicas y las que contienen HA.

Así, la inhibición irreversible de la síntesis de la HA neuronal con α -fluorometilhistidina, en la rata, causa una facilitación de la actividad simpática que conduce a hipertensión arterial,

sugiriendo la existencia de un mecanismo generalizado de autorregulación simpática (Domínguez y col., 1991; Campos y col., 1996).

Hallazgos previos de Campos y colaboradores han demostrado que las situaciones de estrés causan un incremento en la HA sanguínea tanto en las ratas (Campos y Montenegro, 1998) como en los humanos (Campos y col., 1999). Todas estas situaciones están acompañadas por un aumento de la actividad simpática. Así, la estimulación de la actividad simpaticosuprarrenal mediante estímulo eléctrico plantar induce un incremento rápido de los niveles de HA sanguínea (Campos y Montenegro, 1998). Este incremento de los niveles de HA sanguínea es dependiente de la actividad simpática como quedó demostrado por el bloqueo ganglionar o por la simpatectomía química crónica, lo que sugiere que el aumento de la HA sanguínea inducido por estrés depende de la actividad simpática (Campos y Montenegro, 1998).

Además, Campos y col. (1999) demostraron en humanos que situaciones de estrés producido por el ejercicio en la cincha deslizante, el cual se acompaña de incremento de la actividad simpática, se correlaciona con aumentos de los niveles de HA en sangre. Así, en humanos normotensos, un aumento de la actividad simpática, debido al ejercicio físico en la cincha deslizante, es acompañado por una elevación de la HA sanguínea, sugiriendo la presencia de una interacción neuronal similar en humanos. Al contrario, en humanos hipertensos sometidos al mismo grado de ejercicio físico, no ocurre elevación de la HA sanguínea, sugiriendo que tal interacción falla en los hipertensos, lo cual podría estar involucrado en la fisiopatología de la enfermedad (Campos y col., 1999).

En los humanos, los mastocitos se hallan en grandes cantidades en el tejido conectivo laxo de todos los órganos, en especial alrededor de los vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos de la piel, tracto respiratorio superior e inferior y mucosa gastrointestinal. Los sitios de formación y almacenamiento de la HA, aparte de los mastocitos, comprenden las células epidérmicas, la mucosa gástrica, las neuronas del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico (Uvnäs, 1974; West, 1986).

Se ha sugerido la existencia de dos compartimientos periféricos de almacenamiento de la HA: un compartimiento en células mastocitarias, de recambio lento, y un compartimiento celular no mastocitario de recambio rápido, resistente al desgranulador de las células mastocitarias, el compuesto 48/80 (Campos, 1988). Por otro lado, se sabe que la HA en la rata es almacenada predominantemente en la célula mastocitaria del tejido conectivo, por lo que cabe preguntarse cual es el papel de la HA mastocitaria en el reflejo de autorregulación simpática.

En este trabajo estudiamos la posible participación de la HA mastocitaria en el reflejo periférico de autorregulación simpática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para ello, se usó ratas albinas, machos, Sprague-Dawley con peso corporal promedio entre 200 y 300 g, suministradas por el bioterio de la Escuela de Medicina José María Vargas. Las

ratas fueron mantenidas en jaulas metálicas con un ciclo de 12:12 horas de luz-oscuridad. Dichos animales recibieron agua y alimento Ratarina[®] *ad libitum*. Un día antes del experimento, solo recibieron sacarosa al 10% *ad libitum*.

Desgranulación crónica

El compuesto 48/80 fue administrado a las ratas en dosis de 0.75 y 1.0 mg/kg, i.p. diariamente por 12 días. Los grupos controles recibieron solución salina al 0.9% i.p. Posteriormente, se determinó HA en sangre y los parámetros cardiovasculares: presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca, los cuales fueron determinados diariamente al inicio y cuatro días antes de finalizar el tratamiento

Determinación de histamina en sangre

Las ratas mantenidas por 24 horas con sacarosa al 10% *ad libitum*, fueron anestesiadas con pentobarbital sódico, 60 mg/kg i.p., y se les extrajo la sangre de la vena cava inferior para su posterior análisis.

Los niveles de HA sanguínea se determinaron por método fluorométrico (Schwartz y col., 1972; modificado por Campos y Montenegro, 1998). Para la determinación de HA, se desarrolló un fluoróforo por condensación de la amina con o-ftaldehído en un medio fuertemente alcalino. Se incubó el eluido en un baño a 27 °C durante 5 minutos; luego en el mismo baño, a todas las muestras se les agregó 0.16 ml de NaOH 5 N y 0.1 ml de o-ftaldehído al 0.2% en metanol, se esperó exactamente 3 minutos y finalmente la reacción se detuvo con 0.25 ml de H₂SO₄ 3 N (Håkanson y col., 1972).

La lectura de las muestras que contenían HA se realizó en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer (modelo LS50B). Los niveles de la HA fueron calculados por el método del estándar externo (250 mg/ml en HCl 6 N). La dilución del estándar se realizó diariamente hasta una cantidad final de 200 ng de HA. La cantidad de HA en las muestras fue calculada por comparación de intensidad de fluorescencia entre la muestra en estudio y la obtenida con el estándar, y expresada como ng HA/ml de sangre. La recuperación de la HA (100-400 ng) añadida a muestras duplicadas fue del 78%.

Medición de la presión arterial y la frecuencia cardíaca en ratas desgranuladas

Para estimar la actividad simpática, se determinó la presión arterial y la frecuencia cardíaca en las ratas desgranuladas con el compuesto 48/80. Antes de la medición, los animales fueron expuestos a una temperatura de estufa de 40 – 42 °C durante 15 minutos. Luego fueron inmovilizados en una caja de contención. La determinación de los parámetros se hizo mediante un método pletismográfico, no invasor, usando un transductor digital (LE 5001, LETICA Scientific Instruments, Barcelona, España). Se registró la presión arterial sistólica, diastólica (mmHg); y frecuencia cardíaca (latidos/minuto).

Para minimizar el estrés, las ratas fueron entrenadas diariamente con el plestimógrafo tres días antes del experimento. El valor de la presión arterial media y la frecuencia cardiaca se obtuvo como la media aritmética de cuatro o cinco determinaciones consecutivas por día. Estas mediciones se realizaron durante los 4 días anteriores a la finalización del tratamiento con el compuesto 48/80, a fin de evaluar la actividad simpática durante la desgranulación mastocitaria.

Estadística

El análisis de Varianza y el test de Múltiples Comparaciones de Tuckey-Kramer fueron usados para evaluar las diferencias en los niveles de histamina en las muestras sanguíneas, además de los parámetros cardiovasculares.

RESULTADOS

Determinación de histamina en sangre

En la [figura 1](#) se puede observar que los niveles de HA sanguínea en ratas, después del tratamiento diario con 48/80, 0.75 y 1.0 mg/kg i.p., durante 12 días más una dosis desencadenante del compuesto 48/80, no produjeron aumentos en la liberación de HA en las ratas que fueron desgranuladas crónicamente; mientras que la administración aguda i.p. del compuesto 48/80 causó un aumento estadísticamente significativo en las ratas que recibieron solución salina por 12 días i.p. con respecto al control.

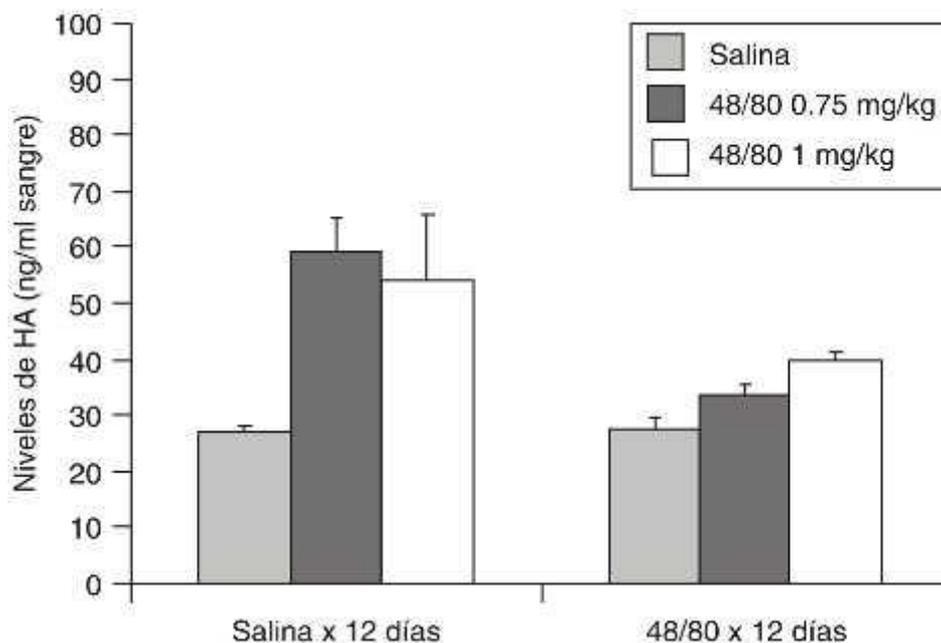
Con esto se demuestra que 12 días del tratamiento con este agente fueron suficientes para alcanzar desgranulación debido a que cuando administramos una dosis aguda desencadenante del compuesto 48/80, los niveles de HA sanguínea en las ratas con desgranulación crónica no fueron modificados. La dosis desencadenante fue efectiva para incrementar la HA en los grupos controles que recibieron salina por 12 días. De nuestros hallazgos podemos inferir que los niveles de HA sanguínea no parecieran provenir del compartimiento mastocitario ya que con 12 días de tratamiento con 48/80, y cuando los mastocitos están bien desgranulados, no se modifican los niveles de HA.

La administración del compuesto 48/80 en dosis de 0.75 (n = 8) y 1.0 (n = 11) mg/kg i.p., no produjo cambios en los niveles de HA sanguínea en las ratas tratadas crónicamente por 12 días ([Fig. 1](#)). El grupo control recibió salina por 12 días (n = 10).

La [Fig. 1](#) muestra los niveles de HA sanguínea en ratas, después del tratamiento diario con 48/80, 0.75 y 1.0 mg/kg i.p., durante 12 días más una dosis aguda desencadenante del compuesto 48/80. Las ratas fueron agrupadas de la siguiente forma: salina 12 días (n = 10); salina 12 días más una dosis aguda de 48/80, 0.75 mg/kg, i.p. (n = 8); 48/80 12 días (n = 8); más una dosis aguda de 48/80, 0.75 mg/kg, i.p. (n = 5).

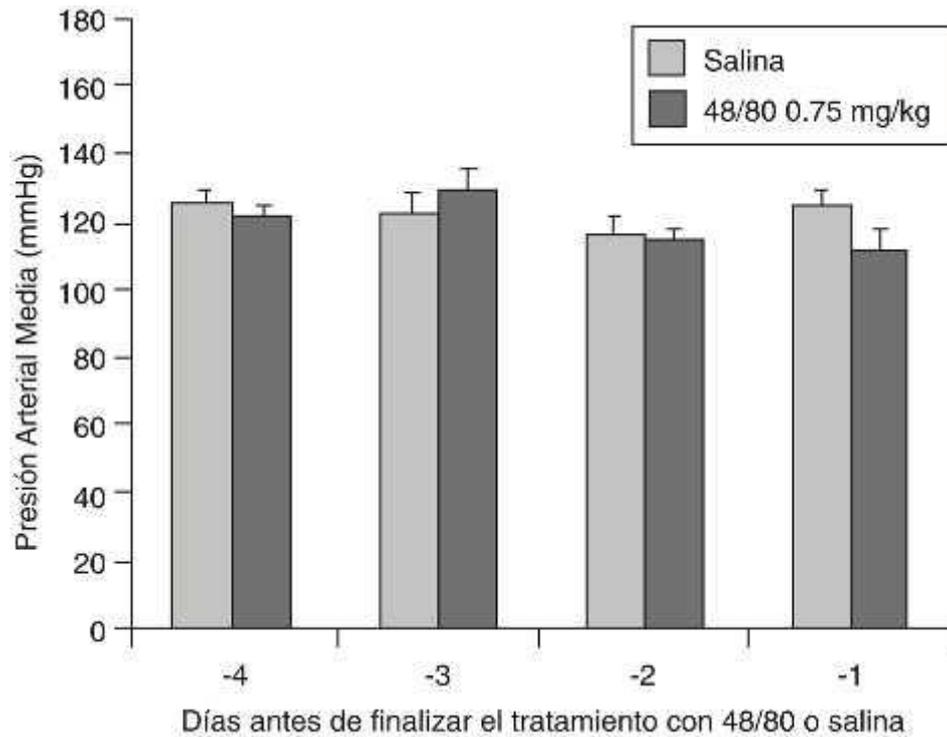
La administración aguda i.p. del compuesto 48/80 causó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) en las ratas que recibieron solución salina por 12 días más el tratamiento agudo desencadenante del compuesto 48/80 en las dosis de 0.75 mg/kg (59.67 ± 5.77 ng/ml sangre) y 1.0 mg/kg (97.12 ± 4.32 ng/ml sangre) i.p., con respecto al control (27.25 ± 0.91 ng/ml sangre).

Figura 1: Niveles de HA sanguínea en ratas



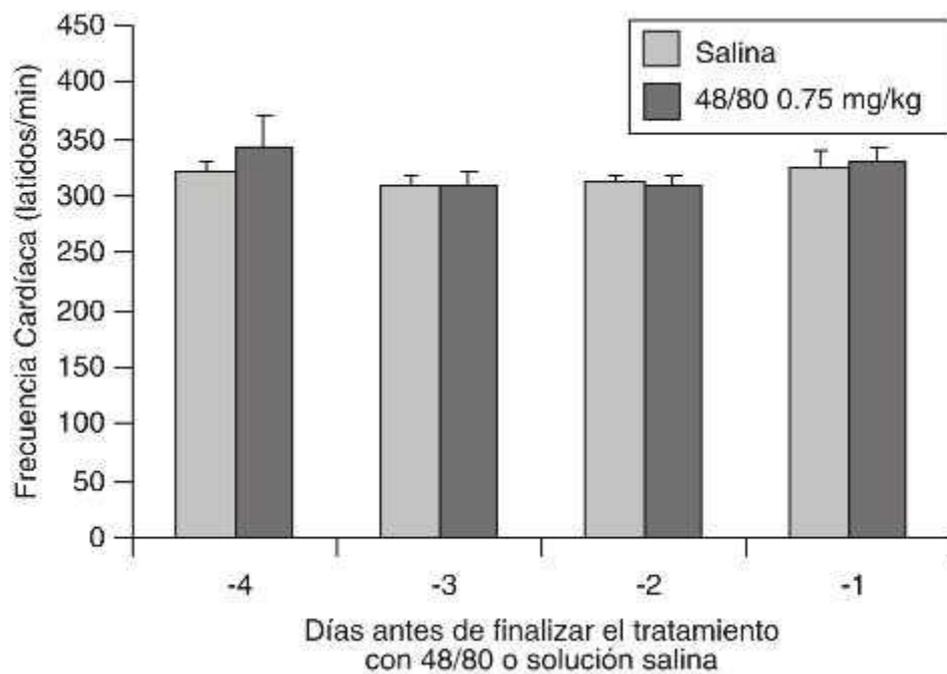
Niveles de HA sanguínea en ratas, después del tratamiento diario con 48/80, 0.75 i.p., durante 12 días. Los otros grupos recibieron salina 12 días ($n = 10$); salina 12 días más una dosis aguda de 48/80, 0.75 mg/kg i.p. ($n = 8$); 48/80 12 días ($n = 8$); 48/80 12 días más una dosis aguda de 48/80, 0.75 mg/kg i.p. ($n = 5$). Los datos son expresados como la media \pm E.E. Vs salina 12 días: *** $p < 0.0001$.

Figura 2: Presión arterial media (mmHg) en ratas



Presión arterial media (mmHg) en ratas tratadas diariamente con 48/80, 0.75 mg/kg i.p., ($n = 8$), durante 12 días. El grupo control recibió salina por 12 días ($n = 8$). Los datos son expresados como la media \pm E.E.

Figura 3: Determinación de la frecuencia cardíaca (latidos/minuto) en ratas



Determinación de la frecuencia cardíaca (latidos/minuto) en ratas tratadas diariamente con 48/80, 0.75 mg/kg i.p., (n = 8), durante 12 días. El grupo control recibió salina por 12 días (n = 8). Los datos son expresados como la media ± E.E.

Medición de la presión arterial y la frecuencia cardíaca en ratas con mastocitos desgranulados

Posteriormente, quisimos estudiar los cambios en los parámetros cardiovasculares durante el proceso de desgranulación mastocitaria. El tratamiento crónico con el compuesto 48/80 no afectó la actividad simpática de las ratas durante los últimos 4 días del tratamiento, porque no se registró cambios ni en la presión arterial media ni en la frecuencia cardíaca, lo que sugiere que la HA mastocitaria no juega un papel importante en el control de la actividad simpática. El tratamiento diario con el compuesto 48/80, 0.75 mg/kg i.p., (n = 8) durante 12 días, en los últimos 4 días del tratamiento, no influyó sobre la presión arterial media (mmHg) ([Fig. 2](#)), ni sobre la frecuencia cardíaca (latidos/min) ([Fig. 3](#)). El grupo control recibió salina por 12 días (n = 8).

DISCUSIÓN

Varios autores han demostrado la presencia de HA en nervios simpáticos periféricos (Kwiatkowski, 1943; Rexed y Euler, 1951; Ryan y Brody, 1972). Se ha demostrado que la HA está parcialmente localizada en el tejido nervioso y en mastocitos del tejido conectivo epidural, perineural y endoneural (McDonald y col., 1981). También se ha señalado la presencia de HA en el ganglio simpático de ratones genéticamente desprovistos de mastocitos (Weinreich, 1985) y en neuronas de ganglio simpático de ratas; en esta especie específicamente se evidenció la presencia de células inmunorreactivas a HA en el ganglio cervical superior y en el complejo ganglionar ciliaco-mesentérico superior, lo que indica la presencia de neuronas que contienen HA en el ganglio simpático (Häppölä y col., 1985).

De manera que para estudiar la posible participación de la HA mastocitaria en el reflejo de autorregulación periférica, utilizamos el compuesto 48/80. Este compuesto es un producto de condensación del p-metoxifenetilmetilamina con formaldehído. Se ha postulado que su principal mecanismo de acción es la desgranulación del mastocito liberando tanto HA como otros constituyentes vesiculares (West, 1986). Además, el 48/80 es muy usado experimentalmente por poseer especificidad relativa y baja toxicidad (Riley y West, 1955).

En este estudio nosotros administramos una dosis del compuesto 48/80, 0.75 mg/kg i.p. demostrando que 12 días después de la desgranulación los niveles de HA sanguínea no se modifican ([Fig. 1](#)). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ohtsuki y col. (1985) quienes demostraron que la administración diaria del compuesto 48/80 por 8 ó 12 días no incrementó los niveles sanguíneos de HA; mientras que la administración diaria del agente aumentó los niveles sanguíneos de HA, 30 minutos después de su administración, a los 2 y 4 días del tratamiento (Ohtsuki y col., 1985). Estos hallazgos son inversamente proporcionales a los encontrados en la desgranulación del mastocito bajo las mismas condiciones del tratamiento,

debido a que estos autores demuestran que a los dos días del tratamiento se observó poco o ningún efecto sobre los niveles de HA en el mastocito. Sin embargo, observaron una disminución significativa de los niveles de HA en el mastocito durante la administración repetida del compuesto 48/80 por 4 (80,2%), 8 (89.1%) ó 12 (91.1%) días.

De nuestros hallazgos podemos inferir que los niveles de HA sanguínea no parecieran provenir del compartimiento mastocitario ya que con 12 días de tratamiento con 48/80, los mastocitos están bien desgranulados con cualquiera de las dosis usadas y los niveles sanguíneos no cambian.

Además, demostramos que 12 días del tratamiento con este agente fueron suficientes para alcanzar desgranulación debido a que cuando administramos una dosis aguda desencadenante del compuesto 48/80, los niveles de HA sanguínea en las ratas con desgranulación crónica no fueron modificados ([Fig. 1](#)). La dosis desencadenante fue efectiva para incrementar la HA en los grupos controles que recibieron salina por 12 días ([Fig. 1](#)).

Se midieron los niveles de HA en sangre total debido a que, en las ratas y otros mamíferos, la HA puede ser recaptada dentro de los elementos celulares sanguíneos. En este sentido, es seguro medir los cambios rápidos en los niveles de HA en la sangre total en vez del plasma (Campos y col., 1999).

Por otra parte, el tratamiento crónico con el compuesto 48/80 no afectó la actividad simpática de las ratas durante los últimos 4 días del tratamiento, lo cual quedó demostrado porque no se registró cambios ni en la presión arterial media ([Fig. 2](#)) ni en la frecuencia cardíaca ([Fig. 3](#)); lo que sugiere que al HA mastocitaria no juega un papel importante en el control de la actividad simpática.

CONCLUSIÓN

De estos estudios se desprende que la histamina mastocitaria, por tanto tiempo estudiada en el campo de la Patología, tiene un papel secundario en la regulación funcional de la actividad simpática, y, por tanto, cobran mayor fuerza las afirmaciones anteriores (Campos, 1988; Campos y Briceño, 1992; Campos y col., 1996) sobre el papel destacado de la histamina neuronal periférica en la regulación funcional del tono simpático a través del reflejo periférico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acuña Y, Mathison Y, Campos HA e Israel A: Thioperamide, a histamine H3-receptor blocker, facilitates vasopressor response to footshocks. *Inflamm Res.* 1998; 47: 109-114.
2. Campos HA: A possible crossed histamine-containing pathway adjacent to the sympathetic system of the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988; 244(3): 1121-1127.

3. Campos HA, Acuña Y, Magaldi L e Israel A: Alpha-fluoromethylhistidine, an inhibitor of histamine biosynthesis, causes arterial hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1996; 354: 627-632.
4. Campos HA y Briceño E: Two models of peripheral sympathetic autoregulation: Role of neuronal histamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 261(3): 943-950.
5. Campos HA y Dominguez J: Interaction between noradrenergic and histamine-containing neurons in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 272(2): 732-738.
6. Campos HA, Losada M y Bravo C: Role of neuronal histamine and capsaicin-sensitive neurons in modulating peripheral sympathetic activity and arterial pressure. *New Adv Cardiovasc Physiol Pharmacol. Excerpta Medica International Congress Series.* Amsterdam. 1998; 217-221.
7. Campos HA y Montenegro M: Footshock-induced rise of rat blood histamine depends upon the activation of postganglionic sympathetic neurons. *Eur J Pharmacol.* 1998; 347: 159-164.
8. Campos HA, Montenegro M, Velasco M, Romero E, Alvarez R y Urbina A: Treadmill exercise-induced stress causes a rise of blood histamine in normotensive but not in primary hypertensive humans. *Eur J Pharmacol.* 1999; 383: 69-73.
9. Dominguez J, Sosa A y Campos HA: Hypertension in the rat induced by alpha-fluoromethylhistidine (Abstract). 9th Scientific Meeting of the Interamerican Society of Hypertension, Rio de Janeiro. *Hypertension* 1991; 17: 428-429.
10. Häkanson R, Rönnberg AL y Sjölund K: Fluorometric determination of histamine with OPT: Optimum reaction conditions and test of identity. *Anal Biochem* 1972; 47: 356-370.
11. Häppöla O, Scinila S, Päivärinta H, Panula P y Eränko O: Histamine immunoreactive cells in the superior cervical ganglion and the celiac-superior mesenteric ganglion complex of the rat. *Histochemistry* 1985; 82: 1-3.
12. Kwiatkowski H: Histamine in nervous tissue. *J Physiol.* 1943; 102: 32-41.
13. McDonald SM, Mezei M y Mezei C: Effect of wallerian degeneration on histamine concentration of the peripheral nerve. *J Neurochem.* 1981; 36: 9-16.
14. Ohtsuki H, Takeuchi K y Okabe S: Effects of prolonged treatment with compound 48/80 on the gastric mucosa and mast cells in the rat. *Japan J Pharmacol.* 1985; 38: 195-198.
15. Rexed B y Euler US: The presence of histamine and noradrenaline in nerve as related to their content of myelinated and unmyelinated fibres. *Acta Phychiat Neurol Scand.* 1951; 26: 61-65.

16. Riley JF y West GB: Tissue mast cells. Studies with a histamine-liberator of low toxicity (Compound 48/80). *J Pathol. Bacteriol.* 1955; 69: 269-282.
17. Ryan MJ y Brody MJ: Neurogenic and vascular stores of histamine in the dog. *J Pharmacol Exp Ther.* 1972; 181(1): 83-91.
18. Schwartz JC, Lampart C y Rose C: Histamine formation in rat brain in vivo: effects of histidine loads. *J Neurochem.* 1972; 19: 801-810.
19. Uvnäs B: The molecular basis for the storage and release of histamine in rat mast cell granules. *Life Sci.* 1974; 14(12): 2355-66.
20. Weinreich D: Multiples sites of histamine storage in superior cervical ganglia. *Exp Neurol.* 1985; 90(1): 36-43.
21. West GB: Mast cells revisited. *Agents Actions.* 1986; 18 (1/2): 5-18.