



03086
8.
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**MECANISMOS DE LA ALERGIA EXPERIMENTAL
EN EL MUSCULO DEL COBAYO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A

GABRIELA SANCHEZ MEJORADA MILLAN

Estela

Ciudad Universitaria, noviembre de 1995.

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I exist as I am, that is enough,
If no other in the world be aware I sit content,
And if each and all be aware I sit content.

One world is aware and by far the largest to me, and that is myself,
And whether I come to my own to-day or in ten thousand or ten million yars,
I can cheerfully take it now, or with equal cheerfulness I can wait.

My foothold is tenon'd and mortis'd in granite,
I laugh at what you call dissolution,
And I know the amplitude of time.

Walt Whitman

AGRADECIMIENTOS:

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, donde, primero bajo la dirección del Dr. Francisco Alonso de Florida[†] y luego bajo la dirección del Dr. Miguel Morales realicé esta tesis.

Al Dr. Francisco Alonso de Florida[†] quien con sus conocimientos, carácter y enseñanzas contribuyó enormemente a mi formación académica.

Al Dr. Miguel Morales Mendoza por todo su apoyo, asesoría y entusiasta participación en el desarrollo de esta tesis.

A mis sinodales: Dr. Horacio Merchant-Larios, Dr. Carlos Larraide Rangel, Dr. Manuel Alcaráz Verduzco, Dr. Pablo Pacheco Cabrera, Dr. Luis Morales Mendoza y Dr. Luis Montaña Ramírez, por sus críticas y sugerencias al trabajo.

Al Dr. Horacio Merchant por su colaboración en la parte de microscopía electrónica.

Al Dr. Luis Morales por su colaboración en el desarrollo del modelo matemático.

A la Maestra Ana Luisa Guzmán por revisar la redacción del manuscrito.

A Irma Rodríguez por su invaluable ayuda técnica en la fase experimental.

[†] *in memoriam.*

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION GENERAL.....	3
CAPITULO 1. DISTRIBUCION DE CELULAS CEBADAS EN EL MUSCULO DIAFRAGMA Y EN LA TRAQUEA DEL COBAYO.....	9
Introducción.....	9
Material y Método.....	13
Resultados.....	17
Distribución de mastocitos en el músculo diafragma.....	17
Simetría entre el hemidiafragma derecho e izquierdo.....	21
Atrofia por denervación.....	22
Distribución de mastocitos en tejido traqueal.....	23
Discusión.....	25
Significado de los mastocitos en la anafilaxia del músculo esquelético denervado.....	28
Significado de los mastocitos en la anafilaxia del músculo liso.....	30
CAPITULO 2. PROBABILIDAD DE UN EFECTO MEDIADO EN LA ANAFILAXIA DEL MUSCULO ESQUELETICO DENERVADO DEL COBAYO.....	37
Introducción.....	37
Material y Método.....	39
Area abarcada por el antígeno y tiempo de exposición.....	39
Densidad de células cebadas.....	39
Coeficiente de difusión.....	40
Resultados y Modelo Matemático.....	44
Coeficiente de difusión.....	44
Ferritina.....	44
Albumina de huevo.....	44
Probabilidades.....	46
El modelo.....	46
Discusión.....	51
CAPITULO 3. LOCALIZACION DE SITIOS DE UNION PARA IgG EN EL MUSCULO LISO DEL COBAYO.....	55
Introducción.....	55
Material y Método.....	57
Resultado.....	59
Localización por inmunoflorecencia de los anticuerpos reagínicos (IgG).....	60
Localización de inmunoglobulinas reagínicas (IgG) con microscopía electrónica.....	60
Discusión.....	63
DISCUSION GENERAL.....	66
REFERENCIAS.....	71

RESUMEN

En esta tesis se estudia la reacción de Schultz-Dale en los músculos esquelético denervado y liso del cobayo. Se ha afirmado en la literatura, que las fibras musculares responden a la acción indirecta de los mediadores farmacológicos liberados por las células cebadas sensibilizadas, que se encuentran en los músculos esquelético denervado o liso. Nosotros sostenemos, que además de este efecto mediado existe un mecanismo directo; es decir, postulamos que las células musculares se sensibilizan y con ello responden a la interacción del antígeno con el anticuerpo, a través de un mecanismo de activación de su membrana plasmática.

Para apoyar esta hipótesis, se realizó un estudio cuantitativo de la población de células cebadas en el diafragma denervado y en la traquea del cobayo, se calculó el coeficiente de difusión del antígeno en el diafragma denervado y se comprobó la existencia de sitios de unión para inmunoglobulinas reagénicas en el músculo liso.

Con esto se comprueba, que el número de células cebadas es insuficiente para explicar la hipótesis del efecto mediado, y por lo tanto, un mecanismo directo es más probable. Por otra parte, la existencia de sitios de unión para las inmunoglobulinas reagénicas en el músculo liso prueba, que las células musculares se sensibilizan y con ello responden directamente al antígeno.

Se concluye, que la reacción de Schultz-Dale en el músculo, es el resultado de la interacción de ambos mecanismos, mediado y directo, los cuales coexisten, suman sus efectos y pueden ponerse de manifiesto por métodos distintos

ABSTRACT

The present thesis is concerned with the aim of investigating some mechanisms of the Schultz-Dale reaction involving denervated skeletal muscle and smooth muscle of the guinea pig. Earlier works indicate that muscle fibers respond to the indirect action of chemical transmitters released by the sensitized mast cells founded either in the denervated skeletal muscle or smooth muscle. However we sustain the hypothesis of the existence of a direct mechanism, i.e. we postulate that the muscle cells are sensitized and therefore respond to the interaction antigen-antibody through a mechanism involving activation of its plasmatic membrane.

In order to support this hypothesis, we carried out a quantitative study of the mast cells population in both denervated diaphragm and tracheal tissue. We calculated the diffusion coefficient of the antigen in the diaphragm, and also, we showed experimental evidence of the existence of bond sites of reaginic immunoglobulins in the smooth muscle.

The number of mast cells was not enough to support the pharmacological mediation mechanism, showing instead a direct mechanism. The results also showed the existence of sites of union between the reaginic immunoglobulins and the smooth muscle, proving in that way that muscular cells are allergized and respond directly to the action of the antigen.

We then concluded that, the allergic reaction of the muscle is the result of a direct mechanism along with an indirect mediated mechanism. Both mechanisms coexist resulting in the allergic response of the muscle and might be develated by different methods.

INTRODUCCION GENERAL

La alergia es la sensibilidad adquirida por algunos individuos a determinados agentes químicos llamados genéricamente antígenos o alérgenos. La sensibilidad se produce cuando el alérgeno se pone en contacto con determinadas células y las induce a generar anticuerpos. Estos son proteínas llamadas inmunoglobulinas, que una vez generadas por las células productoras pasan al torrente sanguíneo y se unen a las llamadas células blanco; ejemplos de estas células son los mastocitos, los leucocitos basófilos y las fibras del músculo liso. El anticuerpo al unirse a ellas les confiere sensibilidad frente al antígeno. La interacción del antígeno con el anticuerpo es el sistema molecular que induce la reacción biológica.

Estrictamente, esta sensibilidad no es adquirida *de novo* ya que si el individuo responde haciéndose alérgico, debe suponerse que la sensibilidad al antígeno preexiste en el organismo. Pero la sensibilidad preexistente es subliminal, de suerte que se manifiesta sólo cuando el proceso de alergización se pone en marcha en el sujeto experimental o en el paciente alérgico.

El descubrimiento de la alergia por Blackley en 1873 ilustra bien la noción de sensibilidad adquirida. Este médico inglés observó en si mismo y en otros pacientes que el polen de pasto, un agente normalmente inocuo en los seres humanos, provocaba ataques de coriza al aspirarlo deliberadamente. Blackley también observó que la aplicación de polen de pasto sobre la piel abrasionada o en la conjuntiva de estos pacientes, causaba reacciones vasculares características del padecimiento. El polen es un ejemplo concreto de alérgeno; muchos otros compuestos pueden

revelarse como alérgenos en diversos casos particulares. Es común encontrar que el polvo de las bibliotecas, la caspa de los animales, la penicilina, el ácido acetilsalicílico, el yodo, ciertos alimentos de composición compleja como el huevo o la leche, etc., son alérgenos para ciertos individuos, pero son inofensivos o producen sólo sus efectos quimioterapéuticos o farmacológicos en otros, sin inducir reacciones patológicas.

La alergia se caracteriza porque los pacientes manifiestan una predisposición genética a adquirir o desarrollar y manifestar tal sensibilidad a sustancias que suelen ser inocuas para los otros individuos. Aunque los mecanismos de esta predisposición no se tratan en el presente estudio, sí se presenta un análisis de los posibles mecanismos responsables de la aparición o instalación de la alergia. Para ello se usará un modelo de alergia experimental ideado por Schultz (1910) y Dale (1913) y conocido desde entonces como "reacción de Schultz-Dale". Este modelo puede tomarse como válido en la clínica, pues corresponde en muchos aspectos al sistema patológico "natural".

La reacción de Schultz-Dale es la respuesta de contracción que se produce *in vitro* en los tejidos alérgizados que contienen músculo liso esquelético o cardíaco, al añadir a la solución salina del baño una dosis del antígeno específico. Se entiende por alérgizar o sensibilizar un tejido, el incorporarle a la membrana los anticuerpos reagínicos (o inmunoglobulinas) específicos para un determinado antígeno. Esta reacción puede tomarse como modelo válido en la clínica, ya que corresponde en muchos aspectos al sistema patológico natural, el antígeno representa en este modelo al alérgeno de la clínica.

Se ha caracterizado con toda precisión a una inmunoglobulina reagínica: la IgE (Ishizaka, Ishizaka y Hornbrook, 1966). Esta inmunoglobulina puede visualizarse, esquemáticamente y para los propósitos de esta tesis, como una proteína cuya molécula está formada de tres cadenas que forman una Y. La cadena vertical de la Y se conoce como fragmento Fc y las dos cadenas superiores gemelas y convergentes de la Y, se designan como fragmentos Fab. Son estos últimos los que tienen la capacidad de reconocimiento antigénico (Amzel y Paljak, 1977; Roitt, 1993).

En la superficie de las células alergizables existen receptores a los cuales se unen de modo específico determinadas superficies atómicas del fragmento Fc de las moléculas de inmunoglobulina reagínica. Estos receptores se conocen como receptores Fc.

Dado que sólo se han descrito receptores Fc en las células cebadas y sus congéneres circulantes, los leucocitos polimorfonucleares (Kinet, 1989), en teoría parecería imposible la sensibilización de otras células diferentes a las mencionadas. Sin embargo, se sabe que muchas otras células pueden ser sensibilizadas tales como: el músculo esquelético (Alonso de Florida, Del Castillo, García y Gijon, 1968), el músculo liso (Guschin, 1976), las células aisladas de músculo liso (Nemoto y Okamura, 1992; Souhrada y Souhrada, 1993), el nervio (Ninomiya, Gijon, y Alonso de Florida, 1972), los macrófagos (Capron, Dessaint, Capron y Bazin, 1975). Es posible que la unión de las inmunoglobulinas reagínicas a células diferentes a los mastocitos o basófilos, sea no a través de un receptor Fc, sino de otro tipo de receptor aún no identificado.

A partir del hecho de que células diferentes a los mastocitos se sensibilizan surge una pregunta crucial para entender cabalmente los mecanismos de la alergia: *¿si estas células sensibilizadas responden directamente al antígeno o son sólo los mastocitos sensibilizados los que responden a la interacción con el antígeno y, por mediación química desencadenan la respuesta alérgica en las demás células?*

Como se ve, la hipótesis más sencilla para responder esta cuestión es que células diferentes a los mastocitos (musculares, nerviosas, macrófagos, etc) pueden sensibilizarse a través de receptores Fc y que la interacción con el antígeno causa la excitación de las células, lo que las conduciría a contraerse en el caso del músculo, de manera similar a como responderían a los agentes farmacológicos. Esta es la llamada hipótesis del efecto directo o hipótesis biofísica de la contracción de Schultz-Dale; históricamente se conoce como la hipótesis de la membrana (Doerr, 1929).

Sin embargo, es otra la hipótesis que prevalece, la conocida como hipótesis de los efectos mediados farmacológicamente o de los efectos indirectos; en la que se postula que son los mastocitos o células cebadas y los linfocitos basófilos del tejido muscular las únicas células que tienen receptores Fc y por lo tanto las únicas alergizables. Como se sabe, los mastocitos responden a la interacción con el antígeno, liberando al menos una sustancia o mediador farmacológico, que puede ser histamina, serotonina, leucotrienos, etc. Estos mediadores después de liberados se difunden en el espacio intercelular del tejido, alcanzan las células musculares y causan una respuesta de contracción (Mongar and Schild, 1962; Ishizaka e Ishizaka, 1984).

La tesis que se sustenta aquí es *que no obstante que existe un efecto mediado, el mecanismo directo también participa en la reacción de alergia*. Para apoyar esta hipótesis realizamos el análisis experimental de los siguientes puntos.

1) En 1968 Alonso de Florida *et al.* demostraron que la interacción del antígeno con el anticuerpo en la superficie celular genera un proceso fisiológico, esto es, la contracción del músculo. Dado que estos experimentos los realizaron en tiras de músculo, cabía la posibilidad de que los mastocitos que se encuentran en el tejido conectivo del músculo, a través de la liberación de sus mediadores farmacológicos, fueran los únicos responsables de dicha contracción. Para descartar esta posibilidad realizamos un estudio cuantitativo de la población de mastocitos en el músculo diafragma denervado y traqueal del cobayo. Este estudio se detalla en el primer capítulo.

2) Por otra parte, calculamos el coeficiente de difusión del antígeno en el músculo diafragma del cobayo, con el fin de conocer la probabilidad de que el antígeno aplicado con una micropipeta (según se realizó en los experimentos antes mencionados de Alonso de Florida *et al.*, 1968) alcance al menos un mastocito situado en el músculo con una concentración suficiente para producir la secreción del mediador farmacológico y que éste a su vez, cause la despolarización de una fibra muscular y que finalmente esta despolarización llegue a un nivel tal, que baste para que se generen potenciales de acción y se induzca la reacción de Schultz-Dale. Tema que constituye el segundo capítulo.

3) Por último analizamos la posible existencia, en el músculo, de sitios de unión o receptores Fc para las inmunoglobulinas reagínicas, semejantes a los descritos para células cebadas y basófilos. Este problema fue abordado con técnicas de inmunocitoquímica y se trata en el capítulo 3. Al terminar estos 3 capítulos a manera de conclusión se presenta una discusión general.

CAPITULO 1

DISTRIBUCION DE CELULAS CEBADAS EN EL MUSCULO

DIAFRAGMA Y EN LA TRAQUEA DEL COBAYO

INTRODUCCION

Como se mencionó en la introducción general de esta tesis, el tejido blanco por excelencia para la reacción de anafilaxia es el músculo liso; de hecho una de las reacciones más conocidas del choque anafiláctico es el espasmo o contracción enérgica y sostenida del músculo liso del tracto respiratorio. Como también se mencionó, según la hipótesis del efecto mediado, esta reacción anafiláctica se produce por el efecto de mediadores liberados por las células cebadas luego de ser activadas por el antígeno. Con el propósito de dilucidar el papel de las células cebadas en la reacción alérgica del tejido muscular, en este capítulo se presenta un estudio morfométrico sobre la población de mastocitos o células cebadas en el músculo esquelético del diafragma y el músculo liso de la tráquea.

Generalmente los mastocitos que se encuentran en el tejido muscular se consideran, según la teoría del "efecto mediado", como los únicos sitios en los que el anticuerpo se une, por lo que se estiman como el blanco de acción de los antígenos (Ishizaka e Ishizaka, 1984). Los mastocitos sensibilizados al interaccionar con el antígeno, liberan compuestos como la histamina, los cuales se difunden entre los espacios intercelulares, alcanzan las células musculares y las

inducen a contraerse como un efecto autofarmacológico (Mongar and Schild, 1962; Stanworth, 1973; Ishizaka e Ishizaka, 1984).

Como ya se dijo antes, además de este efecto mediado, se ha postulado un mecanismo directo de acción (Dale, 1920; Doerr, 1929; Schild, 1956 y 1979; Paton, 1959; Alonso de Florida, 1964 y 1980; Douglas, 1980). La hipótesis del efecto directo de la anafilaxia directa postula que las manifestaciones alérgicas no sólo son el resultado de la acción de los mediadores químicos sobre el órgano de choque, sino que la interacción antígeno-anticuerpo también se puede llevar a cabo sobre células blanco diferentes de las cebadas, como en las células musculares, donde provoca cambios funcionales. Así, tanto en el músculo como en las células secretoras, la interacción antígeno-anticuerpo induce la activación de la membrana, y ésta a su vez activa un sistema de acoplamiento, donde el papel del calcio es al parecer fundamental (Alonso de Florida y del Castillo, 1977).

En la anafilaxia de algunos tejidos musculares alergizados, los dos mecanismos, mediado y directo, pueden coexistir y sumar sus efectos (Guschin, 1976; Alonso de Florida, 1980). Para el caso del músculo diafragma denervado se tiene lo siguiente: por una parte, se ha sugerido que un mecanismo indirecto de acción ocurre en esta estructura, ya que la reacción de Schultz-Dale puede ser inducida con la administración de la histamina y también puede ser inhibida con antihistamínicos (Alonso de Florida, Del Castillo, González y Sánchez, 1965a y b). Por otra parte en 1968 Alonso de Florida *et al.* sugirieron que además de la posible liberación de histamina por los mastocitos, los antígenos pueden ejercer una

acción directa sobre la membrana muscular sensibilizada, produciendo cambios en su permeabilidad similares a los inducidos por la acetilcolina en la unión neuromuscular (Alonso de Florida *et al*, 1968). También encontraron que la aplicación de antígeno con una micropipeta de vidrio en áreas restringidas de las fibras del músculo diafragmático denervado, origina cambios de impedancia y potenciales de acción (potenciales de antígeno) cuya amplitud aumenta cuando la distancia entre la punta de la micropipeta y la superficie celular disminuye.

Sin embargo, Dale y Zilletti (1970) y Chand y Eyre (1978), afirman que el mecanismo directo de acción no ocurre en el músculo diafragma, sino que por ser esta estructura tan rica en mastocitos, los "potenciales de antígeno" se deben al efecto de los mediadores que liberan las células cebadas sensibilizadas al interaccionar con el antígeno. Cabe destacar que la aseveración de que el diafragma es rico en mastocitos se basó en una referencia equivocada, los dos grupos de autores citan, como base para su afirmación, un artículo de Mongar y Schild (1962) que se refiere a la secreción de histamina por diversos tejidos durante la reacción alérgica como una función de la histamina pre-existente, pero en él no se hace mención alguna de las poblaciones de mastocitos. De lo anterior se destaca la relevancia que tiene determinar la población de mastocitos en este músculo. Precisamente, este capítulo contiene este estudio cuantitativo. El número de mastocitos que aquí reportamos no es lo suficientemente grande como para invalidar las conclusiones del estudio electrofisiológico mencionado

De manera colateral al tema de la anafilaxia, pero no menos importante, nuestro estudio también tiene que ver con la cuestión del control trófico del nervio sobre el músculo esquelético (Gutman, 1962; Jolesz y Sreter, 1981). Es sabido que la denervación causa cambios electrofisiológicos y estructurales en el músculo esquelético (Lewis, 1972; Miledi y Slater, 1970). De hecho el cambio más relevante para este trabajo es que el músculo esquelético sólo al denervarse presenta la reacción de Schultz-Dale (Alonso de Florida *et al.*, 1965). Aquí encontramos que además de los efectos ya mencionados, la denervación influye en el tamaño y el patrón de distribución de la población de mastocitos. Al parecer la influencia de un nervio motor afecta la estructura del tejido muscular más allá de los elementos involucrados directamente en los procesos de transmisión y contracción (Sánchez-Mejorada y Alonso de Florida, 1992).

Como en el diafragma, en el músculo liso surge también la siguiente pregunta: *¿hay suficientes células cebadas para inducir, a través del mecanismo indirecto de los mediadores farmacológicos, la respuesta de Schultz-Dale? Si no, esta respuesta podría también aparecer como evidencia colateral del mecanismo directo.*

Como antecedentes existen dos estudios sobre la población de células cebadas en el tracto respiratorio y pulmones de otras especies, uno en el perro (Gold, Meyers, Dain, Miller y Bourne, 1977) y otro en monos (Guerzon, Paré, Michoud y Hogg, 1979). Hacer un estudio comparativo con el cobayo es de gran

relevancia porque esta especie es la que se usa con más frecuencia como modelo experimental de alergia y anafilaxia (Kallós y Kallós, 1984). Otras razones para estudiar la tráquea del cobayo son: a) la anafilaxia de este tejido es mediada principalmente por histamina (Souhrada y Dichey, 1976); b) se conoce la sensibilidad del músculo liso de los anillos traqueales a la histamina (Olmedo, Berumen, Blanco, Cordoba y Alonso de Florida, 1965); c) se sabe la cantidad de histamina que liberan las células cebadas obtenidas del tracto respiratorio de estas especies, después de la administración del antígeno (Pearce, Behrent, Blum, Poblete-Fruadt, Pult y Stand-Voss, 1977), y (d) la respuesta anafiláctica en la tráquea aislada del cobayo puede tomarse como un modelo de asma (Muccitelli, Tucker, Hay, Torphy y Wasserman, 1987).

MATERIAL Y METODO

Se usaron cobayos de uno y otro sexos de aproximadamente 300g de peso. Los cuales se anestesiaron con pentobarbital sódico (33mg/kg) y se sometieron a neurotomía, de aproximadamente 1.5 cm de longitud, del nervio frénico izquierdo a nivel cervical.

Los animales se sacrificaron 21 días después de la denervación mediante un golpe en la nuca. En seguida, en cada animal, se perfundió el sistema circulatorio con solución salina de Ringer-Krebs a pH de 7.4, que contenía: NaCl, 145.0 mM; KCl, 5.92 mM; KH_2PO_4 , 1.18 mM; NaHCO_3 , 24.88 mM; CaCl_2 , 1.27 mM. MgSO_4 , 1.18 mM, previamente burbujeada con mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2 . Para perfundir se cortó la punta del corazón y luego se canuló la arteria aorta a

través del ventrículo izquierdo, con el fin de lavar toda la sangre de los tejidos. A continuación, se obtuvieron muestras de tejido traqueal y de los hemidiafragmas innervado y denervado. Estas muestras de tejido se procesaron para su estudio histológico como se describe a continuación.

En cada animal, se cortaron dos tiras del diafragma en forma de prisma rectangular, una del lado izquierdo denervado y otra simétrica del lado derecho innervado que sirvió como control. Cada tira incluía el músculo y las porciones tendinosas central y de la costilla (Fig. 1.1). La costilla se separó conservando intactas las fibras musculares.

La tráquea se extrajo desde su porción laríngea hasta su bifurcación y bajo microscopio se le quitó el tejido laxo que la envuelve.

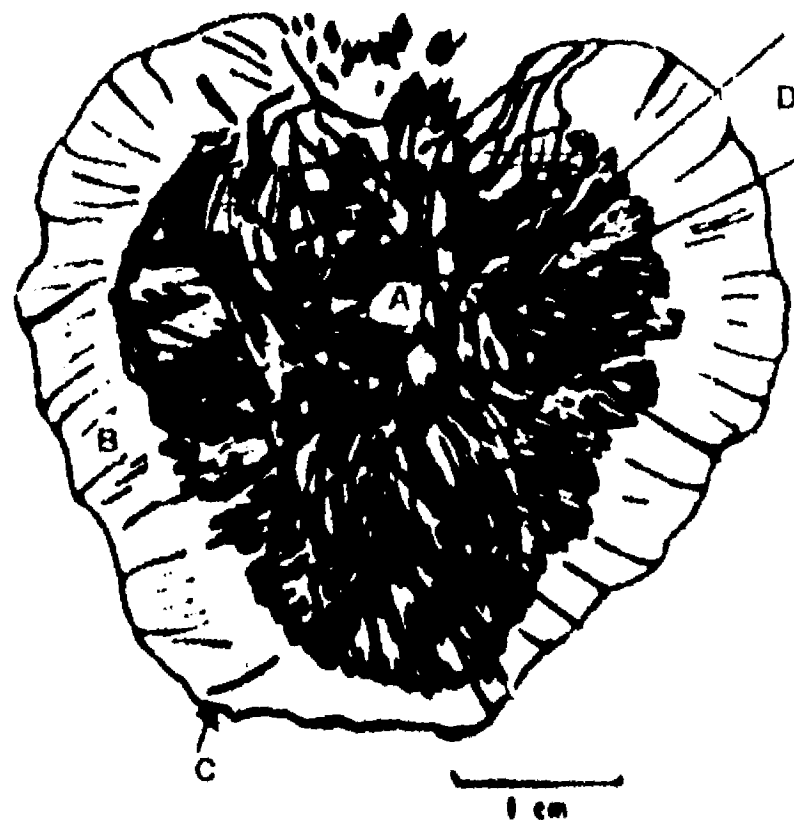


Figura 1.1 Esquema del diafragma del cobayo. (A) tendón central, (B) músculo y (C) sitio de inserción de la costilla. En D se ilustra el tejido incluido en una tira experimental

A continuación los tejidos se fijaron por inmersión en formaldehído al 40% con amortiguador de fosfatos a pH 7 durante dos horas. Se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol (70% al 95%); se impregnaron e incluyeron en JB-4, una resina plástica que preservó la ultraestructura de estos tejidos, lo cual no se logró con inclusión en parafina. De las inclusiones se sacaron cortes semifinos seriados de 10 μm de grosor en un ultratomo LKB 2088. El músculo diafragma se cortó en secciones transversales, con respecto a la dirección de las fibras, la tráquea también se cortó en secciones transversales con respecto al eje cefálico-caudal del cilindro que forma este órgano. Todos los cortes se montaron ordenadamente en portaobjetos y se tiñeron con colorante de Giemsa durante 45 min. se quitó el exceso de colorante poniendo los cortes en agua destilada durante 20 min. Finalmente se observaron en un microscopio fotónico.

Las células cebadas se identificaron por su característica principal que es la presencia de gránulos metacromáticos en su citoplasma (Padawer, 1963; Banks, 1974; Metcalfe, Kaliner y Donlon, 1981). Aunque de forma y tamaño variable, las células cebadas se caracterizaron en general por tener forma oval, diámetro de 14 a 20 μm . núcleo unilobulado, pequeño y localizado en el centro de la célula. Las células así identificadas se contaron en cada corte y al mismo tiempo se determinó su ubicación en los diferentes compartimentos de los tejidos: en el diafragma se observaron en el tendón central, epimisio, perimisio y endomisio; en la tráquea se localizaron en la serosa, mucosa, submucosa y músculo; en el cartilago de esta estructura no se encontraron células cebadas. Cabe aclarar que sólo se contaron

las células cebadas con gránulos ya que son éstos los que contienen los mediadores farmacológicos de la anafilaxia que son de nuestro interés en este estudio. En esta tesis nos referiremos a estas células granulares simplemente como células cebadas o mastocitos.

En vista de que la efectividad de las células cebadas en la anafilaxia está obviamente relacionada con su cercanía al músculo liso, la población de células cebadas encontradas en los diferentes compartimentos de la tráquea se dividieron en dos subclases: las de una zona cercana al músculo (ZCM) y las de otra lejana a él (ZLM) Estas zonas fueron arbitrariamente definidas por dos líneas rectas que van del centro del anillo traqueal a los puntos de inserción del músculo en el cartílago (Fig. 1.2).

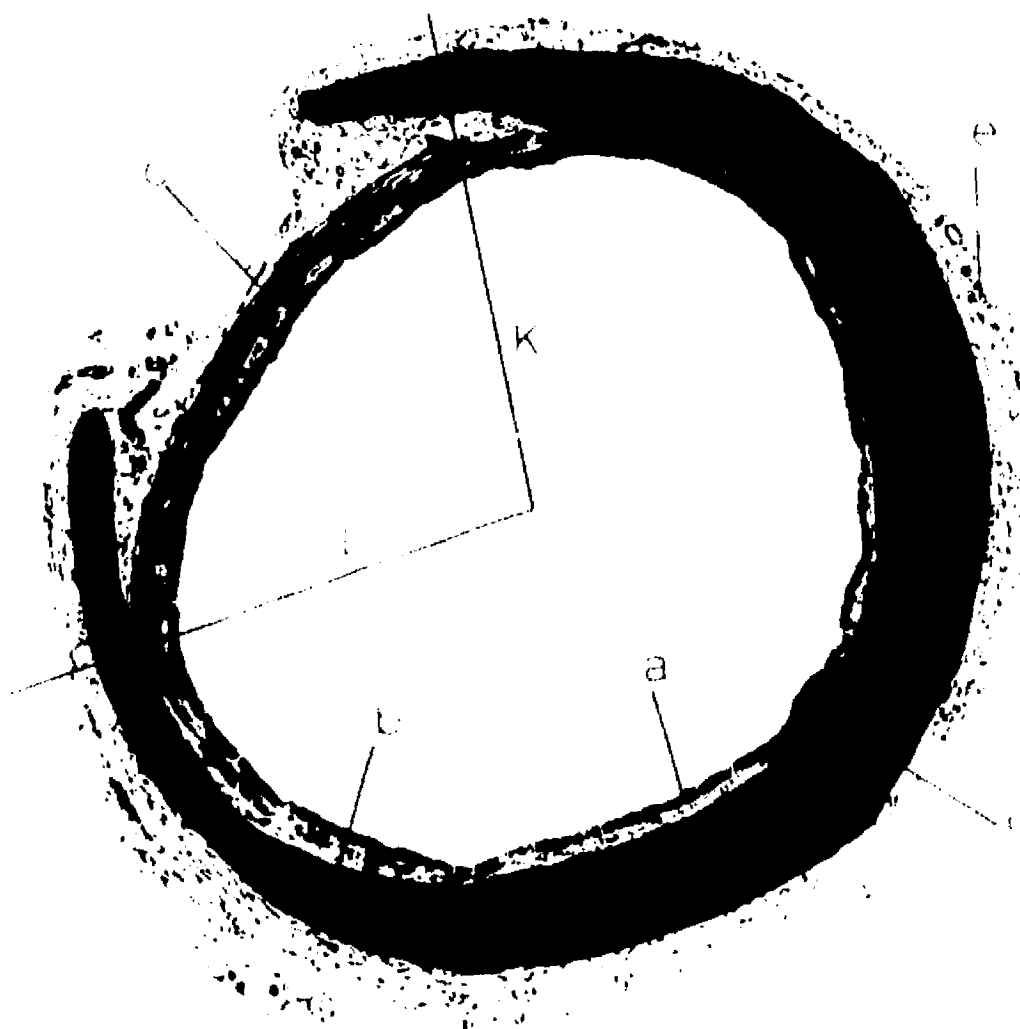


Figura 1.2 Representación esquemática de la histología de un anillo traqueal para ilustrar los diferentes compartimentos del tejido en los que se contaron las células cebadas: (a) mucosa, (b) submucosa, (c) músculo, (d) cartílago, y (e) serosa. Las líneas L y K dividen arbitrariamente el anillo en zonas cercana y lejana al músculo

El volumen en mm^3 de cada corte deshidratado y teñido se calculó midiendo su área en mm^2 y multiplicándola por su grosor (0.01 mm). El área se midió en una fotografía del corte. El volumen de las preparaciones se obtuvo sumando los volúmenes de cada corte. La densidad se determinó como el número de células encontradas dividido entre el volumen de cada porción de tejido.

RESULTADOS

Distribución de mastocitos en el músculo diafragma

En la tabla 1.1 y en la Fig.1.3 se muestra el promedio \pm e.e. (n=10) de células cebadas encontrado en el músculo 45.8 ± 6.8 y en el tendón 228.2 ± 38.6 del diafragma inervado. En el diafragma denervado esta relación se invierte con 190.4 ± 29.5 en músculo y 42.0 ± 3.4 en tendón. Estos datos sugieren que las células cebadas migran del tendón hacia el músculo después de la denervación dado que, las diferencias entre los promedios del número de células cebadas en el músculo (144.6 ± 27.8) y en el tendón (186.2 ± 39.2) de ambas condiciones experimentales no resultan estadísticamente significativas ($P>0.5$).

En la Fig. 1.4 se representa la distribución de mastocitos a lo largo del músculo diafragma, así como los efectos de denervación sobre esta distribución. En el músculo diafragma inervado, un gran número de mastocitos aparece acumulado en el borde del sitio de inserción de las fibras musculares con el tendón central, desde este borde el número de mastocitos contados decrece en ambas direcciones hacia el músculo y hacia el tendón central. El número de mastocitos fue considerablemente mayor en el tendón que en el músculo.

Tabla 1.1. Número de células cebadas en el músculo diafragma (promedios \pm e.e.)

	MUSCULO			TENDON		
	Células	Volumen (mm ³)	Densidad (cél/mm ³)	Células	Volumen (mm ³)	Densidad (cél/mm ³)
Inervado	45.8 \pm 6.8	1.64 \pm 0.22	31 \pm 6	228.2 \pm 38.6	0.24 \pm 0.050	970 \pm 100
Denervado	190.4 \pm 29.5	1.09 \pm 0.07	175 \pm 22	42.0 \pm 3.4	0.18 \pm 0.01	240 \pm 39
Diferencias pareadas	144.6 \pm 27.8 ^(a)	-0.54 \pm 0.23	143 \pm 22	-186.2 \pm 39.2 ^(b)	-0.05 \pm 0.04	-730 \pm 90
t	5.19	2.42	6.58	4.75	1.37	7.48
P, n=10	<.001	\approx .04	<.001	<.001	\approx .2	<.001

Las diferencias entre el número de células cebadas en músculo (a) y tendón (b), como efecto de la denervación, no son significativamente diferentes ($t=0.855$, $P\approx 0.5$). Las diferencias entre las preparaciones inervadas y denervadas son significativas.

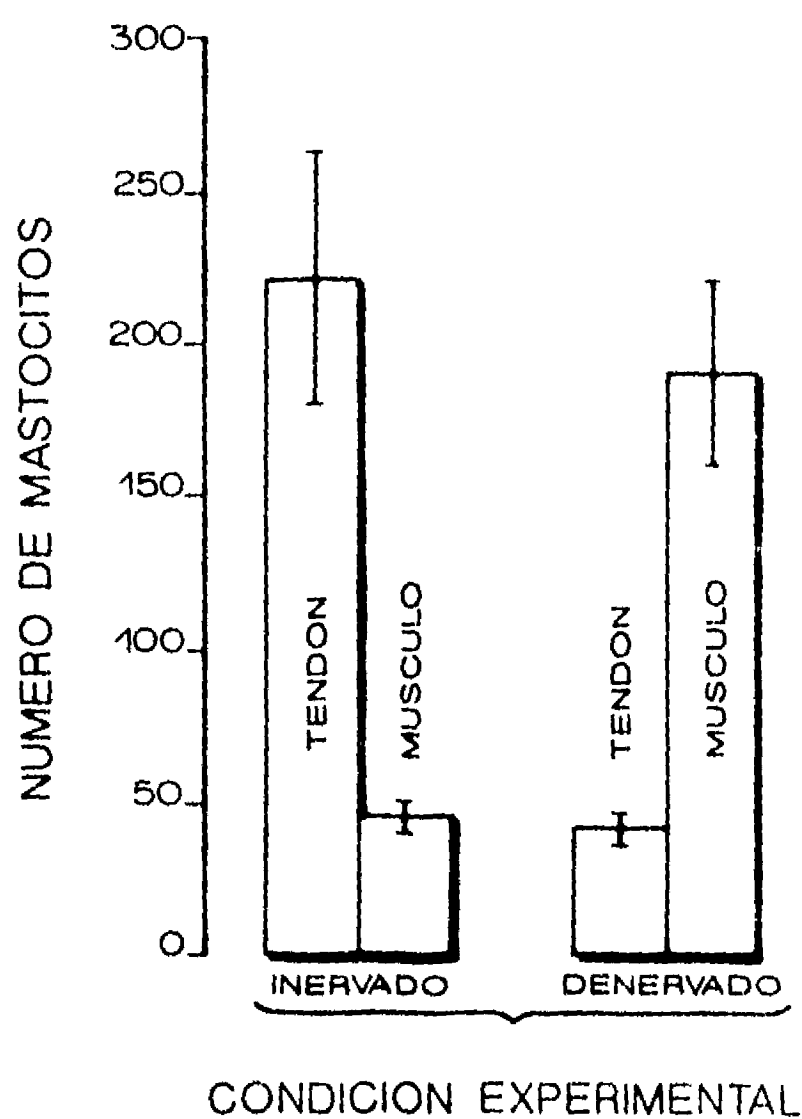


Figura 1.3. Distribución de mastocitos en el tendón y el músculo del diafragma inervado y denervado del cobayo. Las barras son promedios \pm e.e. (n=10). Las diferencias entre músculo y tendón en ambas preparaciones, inervado y denervado, son significativas $P < 0.001$, de acuerdo con la prueba de t para duplicados pareados (Fisher, 1950). (Tomada de Sánchez-Mejorada y Alonso de Florida, 1992.)

Este patrón de distribución de los mastocitos se alteró después de la denervación. Los mastocitos se encontraron aproximadamente a la mitad del músculo. Desde esta región el número de mastocitos decreció en ambas direcciones, hacia el tendón central y hacia el tendón de la costilla.

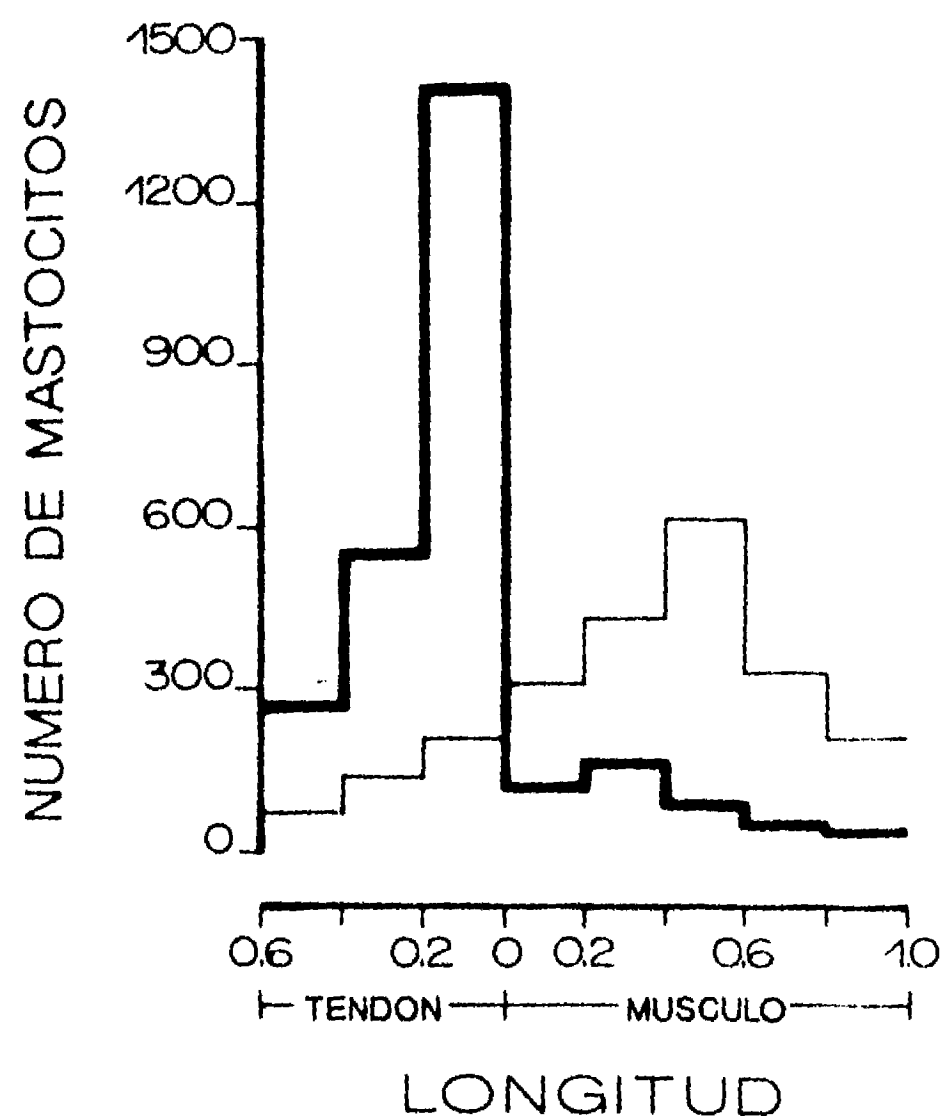


Figura 1.4. Distribución de mastocitos en el tendón y el músculo del diafragma del cobayo. Las abscisas representan fracciones de la longitud del músculo tomada como unidad. El cero es el sitio de inserción del músculo con el tendón central. Las ordenadas son la suma de las cuentas de mastocitos en 10 preparaciones. Líneas gruesas: preparaciones inervadas. Líneas delgadas: preparaciones denervadas. Desde el punto de vista estadístico, los histogramas de frecuencias presentados son equivalentes a tablas de contingencia. Así, a los datos se les aplicaron pruebas de independencia (Fisher, 1950) para determinar las diferencias en el patrón de distribución entre el diafragma inervado y el denervado. La posibilidad de que los tejidos comparados sean independientes, tanto cuando se incluye o no al tendón se rechaza con una $P < 0.001$. (Tomada de Sánchez-Mejorada y Alonso de Florida, 1992).

En la Fig. 1.5 se muestra el patrón de distribución de los mastocitos en los compartimentos del músculo diafragmático: endomisio, perimisio y epimisio. En ambos músculos, inervado y denervado, el endomisio exhibe un número menor de mastocitos que el perimisio o el epimisio. Estos últimos dos compartimentos contienen un número similar de mastocitos. Después de la denervación el número de mastocitos aumentó aproximadamente cuatro veces en todos los compartimentos del tejido conectivo.

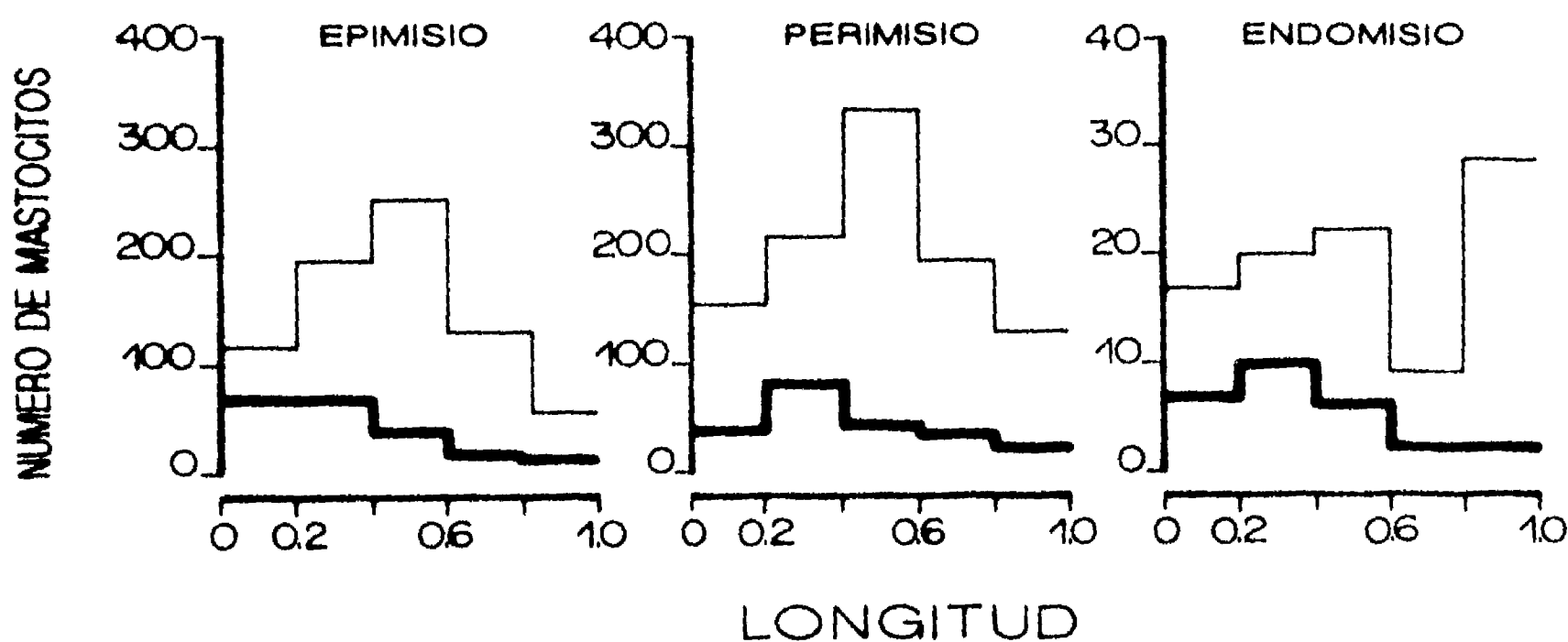


Figura 1.5. Distribución de mastocitos a lo largo del músculo diafragma del cobayo. Las abscisas representan fracciones de la longitud del músculo tomada como unidad. Las ordenadas son la suma de las cuentas de mastocitos en 10 preparaciones. Líneas gruesas: preparaciones inervadas. Líneas delgadas: preparaciones denervadas. Se aplicaron pruebas de independencia. Los patrones de distribución a lo largo del músculo son diferentes en el músculo inervado y el denervado en cualquier compartimento; independencia rechazada en tabla de contingencia de 2 x 5: epimisio $\chi^2=42.17$, $P<0.001$; perimisio $\chi^2=32.4$, $P<0.001$; y endomisio $\chi^2=7.88$, $0.02<P<0.05$. La proporción de cuentas entre el músculo inervado y el denervado fue homogénea en todos los compartimentos; independencia no rechazada en tabla de contingencia de 2x3, $\chi^2=4.41$, $0.1<P<0.2$. (Tomada de Sánchez-Mejorada y Alonso de Florida, 1992).

Los cálculos sobre densidad, esto es cuentas/volúmenes, se presentan en la Fig. 1.6, en la que podemos apreciar que los dos factores, atrofia y redistribución de células cebadas en el diafragma denervado, alteran el patrón de las densidades a lo largo del músculo

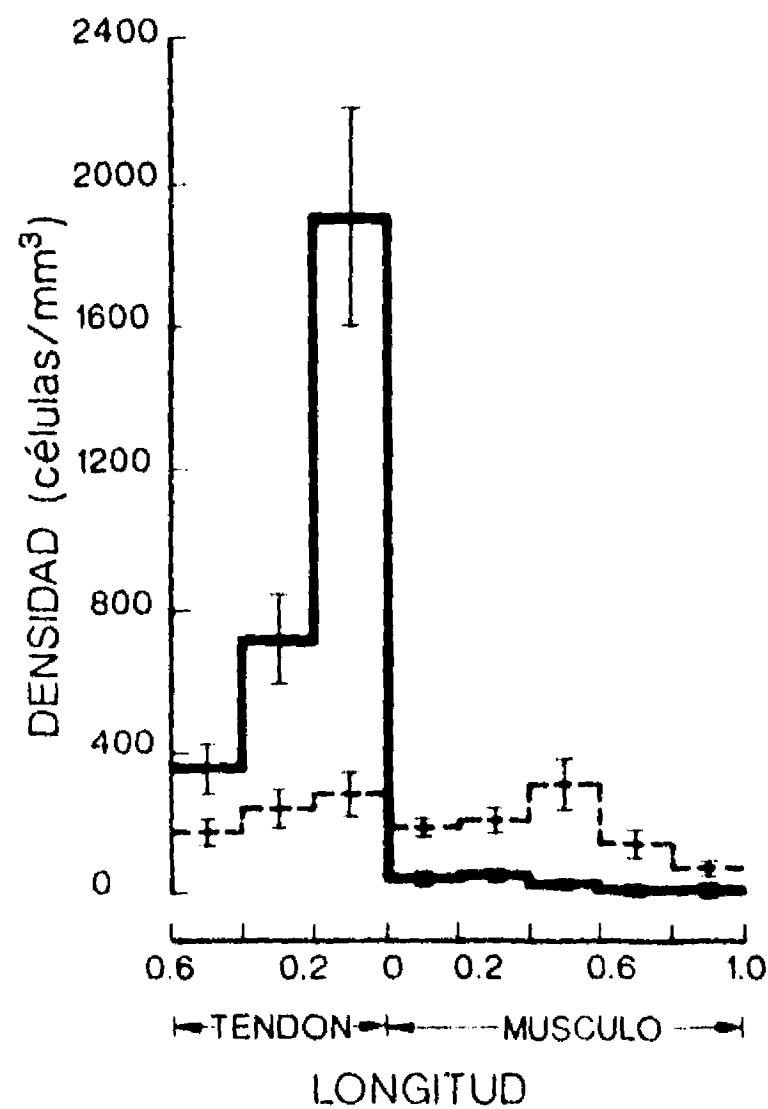


Figura 1.6. Densidad de células cebadas en el tendón y el músculo a varias distancias desde el sitio de inserción del músculo con el tendón. Línea continua: lado inervado; línea discontinua: lado denervado.

Simetría entre el hemidiafragma derecho e izquierdo. Con el propósito de definir si los cambios mencionados en la sección anterior se debieron a la denervación y no son resultado de algún grado de asimetría entre los hemidiafragmas, se realizó un estudio sobre la simetría entre hemidiafragma

derecho e izquierdo. Se escogió el nervio frénico izquierdo para la neurotomía porque, comparado con el derecho, sus relaciones anatómicas permiten una cirugía más fácil. Para probar que el hemidiafragma derecho y el hemidiafragma izquierdo inervados son simétricos, realizamos tres experimentos extras en animales normalmente inervados. Así, obtuvimos tres preparaciones del hemidiafragma derecho que comparamos con 13 preparaciones del lado izquierdo. Diversas pruebas estadísticas no mostraron diferencias entre estas preparaciones en lo que concierne a: (a) distribución de células cebadas a lo largo del músculo y tendón ($\chi^2=0.6634$, $P>0.7$ para homogeneidad en músculo; y $\chi^2=0.5376$, $P>0.7$ en tendón), (b) distribución de células cebadas en los diferentes compartimentos del músculo ($\chi^2=1.519$, $P>0.2$); y (c) volúmenes a varias distancias del sitio de inserción con el tendón ($W>16$ de manera que $W>[3(13+3+1)-w(0.05,13,3)]$). Estos datos control validan las diferencias atribuibles a la denervación.

Atrofia por denervación. Finalmente nuestro estudio morfológico de diafragma confirma los datos de atrofia muscular por denervación reportados por Harris (1974). En efecto, en nuestros experimentos la atrofia fue marcada después de 21 días de la degeneración del nervio. Corroboramos la atrofia estimando el volumen muscular. El volumen del músculo denervado (1.09 mm^3) fue aproximadamente el 65% del volumen del músculo inervado (1.62 mm^3). En la Fig. 1.7 se muestra que la atrofia muscular es más marcada en la vecindad del tendón y que este volumen decrece progresivamente hacia el tendón de la costilla.

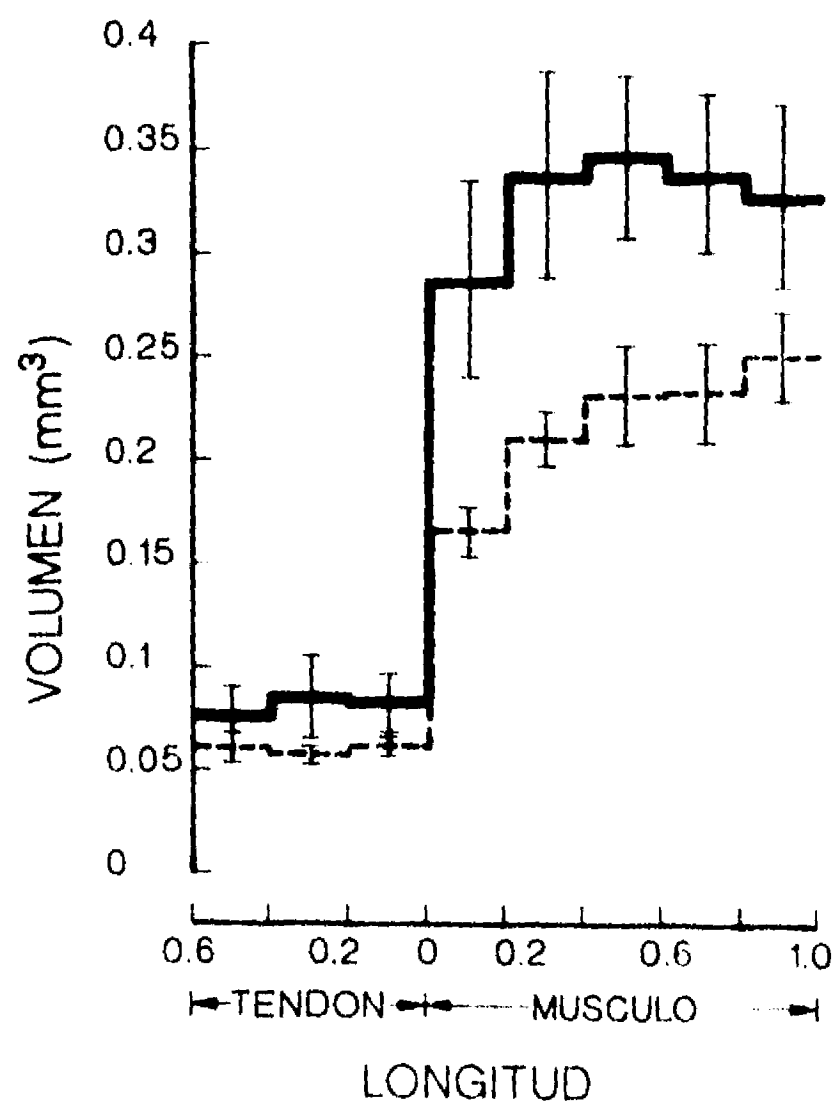


Figura 1.7 Volúmenes medidos en músculo y tendón a varias distancias del sitio de inserción del tendón con el músculo. Línea continua: lado inervado; línea discontinua: lado denervado.

Distribución de mastocitos en tejido traqueal.

Los datos presentados en la tabla 1.11 y el análisis de varianza anidado ($n=5$) muestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de células cebadas encontradas en los compartimentos tisulares de la tráquea estudiados, de acuerdo con la siguiente relación: músculo < serosa < submucosa < mucosa. La densidad de células cebadas en el músculo (3×10^2 cél/mm³) es aproximadamente dos órdenes de magnitud más pequeña que en la

mucosa (4.8×10^4 cél/mm³) o que en la submucosa (2.4×10^4 cél/mm³). La densidad en músculo es del mismo orden de magnitud que en la serosa (8×10^2 cél/mm³).

Tabla 1.II. Promedios \pm e.e. (n=5) del número de mastocitos (N), volúmenes (V) y densidades (N/V) en los diferentes compartimentos de la tráquea del cobayo.

	ZCM			ZLM		
	N	V(mm ³)	N/V(cél/mm ³)	N	V(mm ³)	N/V(cél/mm ³)
Serosa	538 \pm 92	0.37 \pm 0.01	1427 \pm 220	7 \pm 3	0.31 \pm 0.03	23 \pm 8.1
Submucosa	1545 \pm 252	0.05 \pm 0.004	27447 \pm 5114	4925 \pm 385	0.22 \pm 0.03	24130 \pm 2766
Mucosa	1904 \pm 357	0.04 \pm 0.004	44488 \pm 9153	5169 \pm 357	0.11 \pm 0.01	49480 \pm 7635
Músculo	41 \pm 8	0.15 \pm 0.03	300 \pm 62			

ZCM: zona cercana al músculo; ZLM: zona lejana al músculo

La densidad de células cebadas es mayor en la ZCM que en la ZLM en todos los compartimentos, excepto en la mucosa. En la serosa esta diferencia es muy grande, aproximadamente dos ordenes de magnitud: en la ZLM hay 2.2×10^2 cél/mm³ contra 1.4×10^3 cél/mm³ en la ZCM. Las diferencias entre submucosa y mucosa son relativamente pequeñas: 2.4×10^4 cél/mm³ en la ZLM contra 2.7×10^4 cél/mm³ en la ZCM en submucosa, y 4.9×10^4 cél/mm³ en la ZLM contra 4.4×10^4 cél/mm³ en la ZCM en la mucosa. De acuerdo con el análisis estadístico (ANDEVA anidado) la densidad de mastocitos es mayor en la ZCM que en la ZLM en todos los compartimentos, excepto en mucosa, donde esta prueba no reveló diferencias a un nivel de significancia de 0.05.

DISCUSION

Los resultados presentados en este capítulo muestran la presencia de células cebadas en el músculo diafragmático del cobayo y además, que su distribución entre el tendón y el músculo es dependiente de la inervación. Encontramos que en el músculo inervado las células cebadas se localizan predominantemente en el tendón central y que después de la denervación esta relación se invierte.

Para explicar este fenómeno planteamos dos hipótesis, la primera consiste en la posibilidad de que las células cebadas migren del tendón hacia el músculo después de la denervación. Este fenómeno podría estar dado por inhibición del nervio sobre la migración celular, vía neurotransmisores, la cual se suprimiría después de la denervación, de manera similar a los cambios estructurales y funcionales del músculo que ocurren durante la degeneración del nervio (Miledi y Slater 1970). En este sentido, el hecho de que después de la denervación las células cebadas se acumulen en la región media del músculo, donde normalmente se localizan las sinápsis (Ham, 1979), sugiere la liberación de factores tróficos nerviosos en el músculo inervado, así como, un mecanismo compensador en el músculo denervado, consistente en la liberación de mediadores por las células cebadas, involucrados en la contracción muscular. La segunda hipótesis es que la denervación no induzca cambios en el número de células cebadas sino más bien cambios en el número de sus granulos, facilitando o dificultando su identificación histológica. Esto se puede explicar argumentando que el nervio a través de

neuropéptidos, activa a las células cebadas induciendo su degranulación, y que al denervar se inhibe la activación y por lo tanto los mediadores farmacológicos permanecen dentro de los granulos citoplasmáticos, dando lugar a una aparente disminución y aumento, respectivamente, en el número de células cebadas. Al respecto se sabe que la denervación causa alteración en la densidad de células cebadas, por ejemplo Ganguly *et al.* (1978) observaron un aumento en la cantidad de células cebadas granulares del estómago de la rata, después de la sección del nervio vago. También se sabe que existe interacción morfológica (Skofitsch, Savitt y Jacobowitz, 1985; Williams, Bienenstock y Stead, 1995) y funcional (Bienenstock, Blennerhassett, Tomioka, Marshall, Perdue y Stead, 1989; Cherubini, Ben Ari, Gho, Bidard y Lazdunski, 1987; Weinreich, Udem, Taylor y Barry, 1995) entre células cebadas y nervios. En este sentido se han descrito algunos neuropéptidos como son el factor nervioso del crecimiento (Aloe y Levi-Montalcini 1977), la sustancia P (Foreman y Jordan, 1984) y el péptido degranulador de células cebadas (Cherubini *et al.* 1987), capaces de degranular a las células cebadas

Dado que una de las características de las células cebadas es su capacidad de migración (Miller, 1980) y con base en que después de la denervación encontramos que el número de células cebadas perdido por el tendón es igual al ganado por el músculo (Sánchez Mejorada y Alonso de Florida, 1992), me inclino por la hipótesis de migración de las células cebadas.

Con los datos existentes no se puede resolver cual de los dos mecanismos propuestos participa en este proceso. Para probar experimentalmente que las

células cebadas migran del tendón al músculo, después de la denervación, podríamos identificarlas utilizando IgG₁ marcadas con peroxidasa, ya que se sabe que en el cobayo existen receptores de membrana para estas inmunoglobulinas y aunque estos receptores no son exclusivos de las células cebadas nos permitirían identificarlas aun degranuladas. Así mismo, la migración celular podría inferirse si *in vitro* separamos el tendón del músculo eliminado así la posibilidad de que las células cebadas que están en el tendón pudieran migrar hacia el músculo. Si después de la denervación de todos modos el número de éstas aumenta en el músculo, esto nos indicaría que el nervio induce de alguna manera la degranulación de estas células. Por otro lado, probar que la sección del nervio frénico inhibe la activación de las células cebadas en el músculo es factible ya que por un lado se podrían identificar con técnicas de inmunocitoquímica los neuropéptidos que se sabe inducen la degranulación de las células cebadas y por otro lado se podría revertir la denervación aplicando exógenamente estos péptidos y de esta manera ver que acontece con la población de mastocitos.

Ambas posibilidades, migración de células cebadas o aumento de sus gránulos, inducirán una respuesta compensadora para mantener la función fisiológica del músculo, que es la contracción. Así, el aumento de células cebadas en el músculo diafragmático denervado del cobayo estaría asociado al desarrollo de receptores a histamina en este tejido (Alonso de Florida *et al.*, 1965a; Alonso de Florida, *et al.*, 1965b). Por lo tanto se podría esperar que la secreción regular de histamina por las células cebadas genere tono y contractilidad de las fibras del

músculo denervado. De hecho, el tono y la contractilidad espontánea son características observadas en el diafragma denervado (Alonso de Florida *et al.*, 1965).

El aumento de células cebadas en el diafragma después de la denervación, y el hecho de que ésta sea condición necesaria para que la reacción de Schultz-Dale se produzca en este tejido, parece apoyar la teoría del efecto mediado de la anafilaxia. No obstante, cabe recalcar que la densidad de células cebadas encontrada en el músculo esquelético, no es suficiente para explicar la teoría del efecto mediado en la reacción de Schultz-Dale.

Significado de los mastocitos en la anafilaxia del músculo esquelético denervado.

Estos resultados apoyan la existencia de un mecanismo directo. Dado que, el número de mastocitos encontrado es tan pequeño, un cálculo grueso (capítulo 2) fue suficiente para mostrar que la probabilidad de alcanzar los mastocitos con descargas de antígeno desde una micropipeta, como en el experimento de Alonso de Florida y cols. (1968) mencionado en la introducción, es insignificante. Lo más probable bajo estas circunstancias, es que el antígeno, al interaccionar con el anticuerpo directamente sobre las fibras musculares, induce la acción excitatoria.

Los datos sobre densidad de células cebadas (d), capacidad de liberación de mediador por célula (m) y concentración de mediador necesaria para inducir una contracción (c) se pueden relacionar de tal manera que $m=c/d$. Y en efecto, la inversa de la densidad de células cebadas ($1/d$), es el volumen de tejido ocupado

por cada célula cebada, capaz de liberar una cierta cantidad de mediador m , para alcanzar la concentración c , así mismo suficiente para inducir una contracción muscular de una magnitud dada. Esta relación se puede representar con un nomograma (Fig. 1.8), y en este sentido puede relacionarse con la anafilaxia si nosotros conocemos las concentraciones de antígeno necesarias para producir las contracciones equivalentes. La respuesta máxima a histamina en este tejido es inducida por 1 ng/mm^3 y el 50% de la respuesta máxima por 100 pg/mm^3 (Alonso de Florida *et al*, 1965b). Se sabe que estas respuestas a histamina son similares a las inducidas por el antígeno (Gutiérrez-López y Alonso de Florida, 1980).

De acuerdo con el nomograma, tenemos que la capacidad promedio de liberación de histamina de las células cebadas en este músculo, requerida para producir el 100% y el 50% de la contracción de Schultz-Dale con 175 células/mm^3 , que es la densidad promedio de células cebadas encontrada en el músculo denervado, es aproximadamente 6 y 0.6 pg/célula respectivamente. Estas cifras son de un orden de magnitud y del doble más altas que la capacidad de liberación de las células cebadas del tracto respiratorio que es de 0.3 pg/célula (Pearce *et al*, 1977). Además, para inducir la respuesta máxima y el 50% de la respuesta máxima con 304 células/mm^3 , que es la densidad más alta encontrada a la mitad del músculo entre sus inserciones, la cantidad de mediador necesaria es menor, aproximadamente 3.0 y 0.3 pg/célula respectivamente, pero estas concentraciones están aún en un rango más alto que las de las células cebadas del tracto respiratorio. Las células cebadas del peritoneo de la rata tienen una capacidad de

liberación de 6 pg/cél (Befus, Pearce, Gauldie y Horsewood, 1982), que es la capacidad más alta conocida de todas las clases de células cebadas.

Solo si asumimos que la capacidad de liberación de las células cebadas localizadas en el músculo esquelético denervado es muy alta, cuando menos tan alta como la de las células cebadas del peritoneo, la contracción de Schultz-Dale observada (Alonso de Florida *et al*, 1965b) cuando se aplicó el antígeno, podría explicarse por la hipótesis del efecto mediado. Sin embargo, la estimación de la cantidad de mediador liberado por cada célula cebada (m) obtenida en el nomograma, debe ser de una u otra manera diferente que los valores reales en el tejido, porque algo de mediador debe perderse en el proceso o en otros mecanismos autofarmacológicos. Desafortunadamente, dado el número tan bajo de células cebadas en este tejido, sería muy difícil aislarlas para determinar su capacidad real para secretar histamina

Significado de los mastocitos en la anafilaxia del músculo liso.

La baja densidad de células cebadas en el músculo traqueal, la cual es menos de la mitad que en la serosa y aproximadamente dos órdenes de magnitud menor que en mucosa y submucosa, no parece apoyar la afirmación de que la contracción del músculo liso traqueal inducida con el antígeno es mediada por estas células (Souhrada y Dichey, 1976; Chand y Eyre, 1978). De hecho, la histamina ha sido propuesta como el principal mediador en este músculo (Souhrada y Dichey, 1976; Chand y Eyre, 1978), pero la cantidad de histamina

requerida para este propósito es mucho mayor que la capacidad de secreción de las células cebadas.

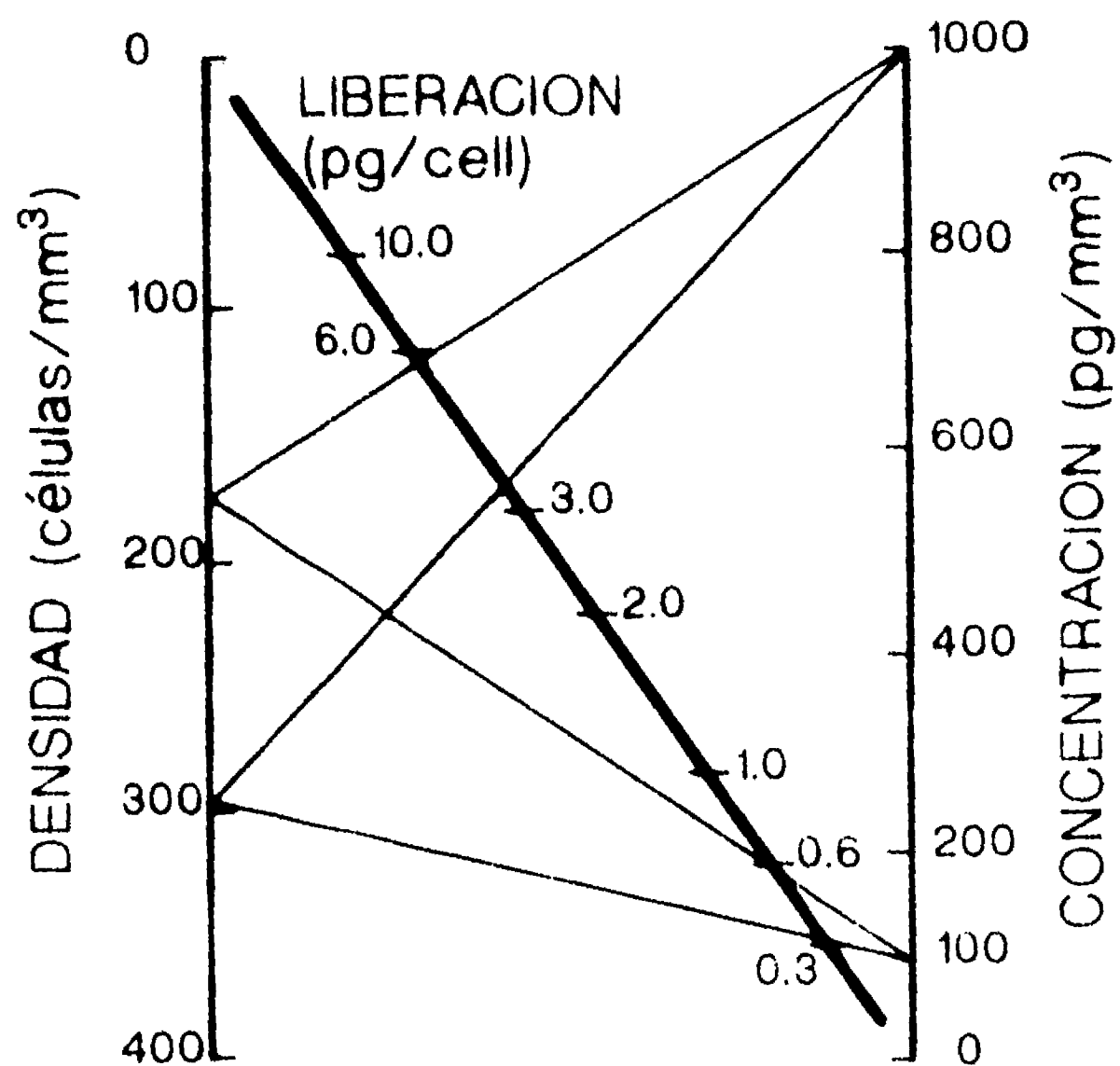


Figura 1.8. Nomograma que relaciona la densidad de células cebadas con la concentración de mediador y la cantidad de mediador liberado. Se muestran dos valores de densidades de células cebadas: uno, 175 $\text{cél}/\text{mm}^3$, que es la densidad promedio encontrada en el músculo; el otro, 304 $\text{cél}/\text{mm}^3$, que es la densidad encontrada a la mitad del músculo. Se dibujaron líneas desde estos puntos (densidades) a los puntos que representan la concentración de mediador (histamina) necesario para producir la respuesta máxima (1000 pg/mm^3) o el 50% de la respuesta máxima (100 pg/mm^3) de la contracción del músculo. Estas líneas intersectan la escala que representa la cantidad de mediador requerido para ser liberado por cada célula cebada, para poder alcanzar la concentración de mediador indicada.

Para inducir una concentración máxima se debe alcanzar en los alrededores de las fibras musculares una concentración de aproximadamente 10 mg/ml (o 10 ng/mm³) de este compuesto (Olmedo *et al*, 1965). Conviene resaltar que esta concentración es un orden de magnitud mayor que la correspondiente en diafragma. Una contracción máxima inducida por el antígeno es de la misma tensión, o ligeramente menor, que una contracción máxima inducida por histamina (Alonso-deFlorida y Del Castillo, 1977). Por otro lado, la densidad de células cebadas en el músculo traqueal es de sólo 300 cél/mm³ (tabla 1.11). Así, de acuerdo con el nomograma que relaciona estas cantidades (Fig. 1.9), una sola célula debería secretar aproximadamente 30 pg de histamina para alcanzar la concentración requerida para inducir una respuesta máxima. No obstante, Pearce y cols. (1977) reportan que las células cebadas del pulmón del cobayo liberan aproximadamente 0.3 pg/cél. Si asumimos que las células cebadas del músculo liso de la tráquea de la misma especie, tienen una capacidad similar para liberar histamina, la cantidad liberada sería aproximadamente dos órdenes de magnitud más pequeña que la requerida para explicar el postulado de la mediación farmacológica.

Podríamos de alguna manera relajar el argumento considerando, no la dosis capaz de inducir la respuesta máxima sino la que induce el 50% de la respuesta máxima, 1 mg/ml (o 1 ng/mm³) (Olmedo *et al*, 1965). Pero aún así, la cantidad de mediador que se requeriría que secretara cada célula para alcanzar esta concentración sería de aproximadamente 3 pg, la cual es todavía menor por un

factor de 10 con respecto a la capacidad de secreción de las células cebadas del tracto respiratorio.

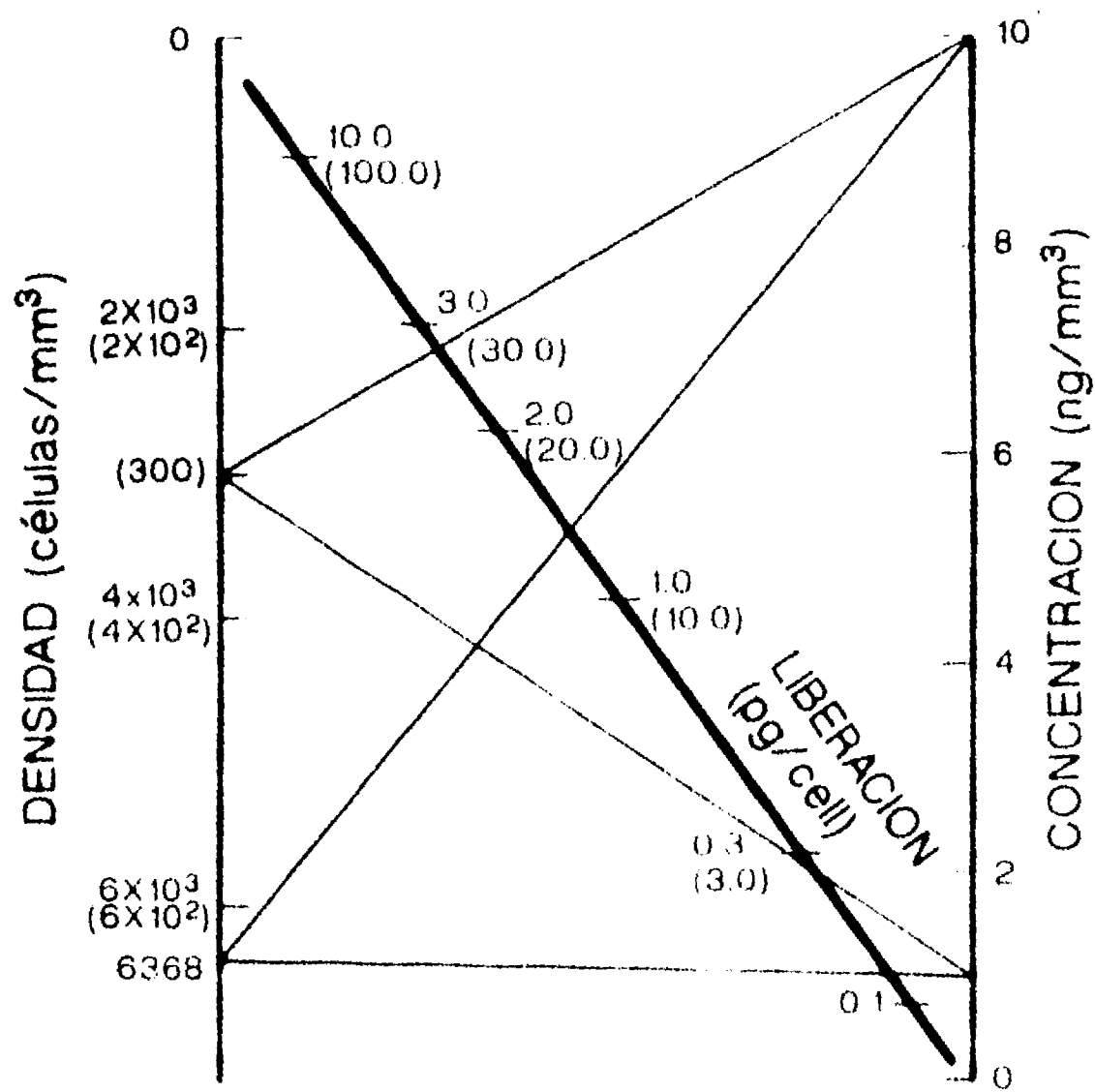


Figura 19. Nomograma que relaciona la densidad de células cebadas con la cantidad de mediador liberado y concentración de mediador. Para las cantidades relativamente pequeñas se usan las cifras entre paréntesis tanto para las escalas de liberación como para las de densidad. Se muestran dos valores de densidades de células cebadas: uno, el encontrado solo en el músculo, aproximadamente 300 células/mm³; el otro, 6368 células/mm³, que es la densidad encontrada en todos los compartimentos del tejido que rodean a las fibras musculares en la ZCM. Se dibujaron líneas desde estos puntos (densidad) a los puntos que representan la concentración de mediador (histamina) necesario para producir la respuesta máxima (10 ng/mm³) o el 50% de la respuesta máxima (1 ng/mm³) de la contracción del músculo. Estas contracciones son ligeramente menores que las que corresponden a la contracción máxima y al 50% de la contracción máxima de la respuesta de Schultz-Dale. Estas líneas intersectan la escala que representa la cantidad de mediador requerido para ser liberado por cada célula cebada, para poder alcanzar la concentración de mediador indicada.

Si consideramos la heterogeneidad de las células cebadas (Bienenstock, 1988) y especulamos que las células cebadas del músculo liso de la tráquea del cobayo pueden liberar tanta histamina como 6 pg/cél, que es la cantidad de

histamina que liberan las células cebadas del peritoneo de la rata (Befus *et al*, 1982), esta cantidad aún no es suficiente para explicar el efecto mediado ya que es aproximadamente cinco veces menor que la requerida para producir la respuesta máxima, pero sí es suficiente para producir el 50% de la respuesta máxima.

En vista de estos resultados, podríamos considerar una situación extrema, esto es, que todas las células cebadas que se encuentran en los diferentes compartimentos de la tráquea en la ZCM (6368 cél/mm³) y no sólo las que se encuentran en el músculo, contribuyen para inducir a las células musculares a producir la contracción máxima en respuesta al antígeno. Bajo estas circunstancias, la cantidad de histamina que se requeriría que secretara cada célula cebada sería 1 pg/cél, la cual es 3 veces menor que la capacidad de secreción de las células del peritoneo de la rata.

Sin embargo, sabemos que el mediador principal en la anafilaxia de la tráquea del cobayo es la histamina y que la mayor cantidad de esta se libera durante los dos primeros minutos después de la administración del antígeno (Undem, Pickett, Adams, 1987). Además, el uso de antagonistas de los receptores H₁ como la pirilamina bloquean solo el 50% de la respuesta al antígeno (Vargas, Montaña, Vanda, Segura, Selman, 1990). Estos datos en su conjunto nos sugieren que en la reacción de Schultz-Dale del músculo liso traqueal del cobayo, además de la histamina pueden intervenir otros mediadores tales como prostaglandinas y leucotrienos. De hecho, el uso combinado de antagonistas de receptores H₁ ya

sea con antagonistas de los leucotrienos o con inhibidores de biosíntesis de leucotrienos no llegan a bloquear totalmente la respuesta al antígeno (Daffonchio, Payne y Whittle, 1987). Pero, la interacción de antagonistas H_1 con antagonistas muscarínicos e inhibidores de la biosíntesis de leucotrienos y prostaglandinas, inhiben de manera muy importante la respuesta al antígeno (Vargas *et al.* 1990). La respuesta residual al antígeno, que no puede ser bloqueada con la interacción de estos fármacos, podría explicarse como un efecto directo del complejo antígeno-anticuerpo sobre la membrana muscular.

Por otro lado, la densidad de células cebadas es menor en otras especies. En el perro, Gold y cols. (1977) encontraron cerca de 11 cél/mm^2 (aproximadamente 2700 cél/mm^3 , considerando el espesor de $4 \mu\text{m}$ de las secciones) en la tráquea, y 75 cél/mm^2 (aproximadamente 18700 cél/mm^3) en tracto respiratorio distal. En el mono (*Macaca fascicularis*) Guerzon y cols (1979) encontraron en promedio 374 cél/mm^3 en la tráquea, y aproximadamente 1000 cél/mm^3 en el tracto respiratorio terminal. Desafortunadamente estos autores no dan ningún dato de las cuentas de células cebadas en el músculo del tracto respiratorio, pero sus datos globales en estas especies no soportan la teoría de los mediadores farmacológicos pero sugieren la participación de un mecanismo reflejo (Gold *et al.*, 1977) o la presencia de mecanismos complejos como un incremento en la permeabilidad de la mucosa, lo cual supuestamente permitiría la entrada de más antígeno a las paredes y así amplificaría la respuesta (Guerzon *et al.*, 1979).

Finalmente, podemos concluir que la respuesta de Schultz-Dale en el músculo liso del cobayo, es el resultado de la interacción de varios mecanismos, los cuales coexisten, suman sus efectos y pueden ponerse de manifiesto por métodos distintos.

CAPITULO 2

PROBABILIDAD DE UN EFECTO MEDIADO EN LA ANAFILAXIA DEL MUSCULO ESQUELETICO DENERVADO DEL COBAYO

INTRODUCCION

En un estudio experimental Alonso de Florida y colaboradores (1968) llegaron a los primeros resultados que sustentan los postulados de los mecanismos directos de la teoría de la membrana. Utilizaron el diafragma denervado del cobayo alergizado, pues ya se había comprobado anteriormente (Alonso de Florida *et al.*, 1965a y b) que este músculo se comporta en mucho como el músculo liso, por cuanto produce la reacción alérgica *in vitro* y da efectos farmacológicos comparables. Además, el gran calibre de las fibras musculares del músculo esquelético ofrecen al investigador una estructura que facilita aplicar las técnicas electrofisiológicas. Los experimentos consistieron en administrar el antígeno por medio de una microválvula o micropipeta de vidrio, cuya embocadura, muy pequeña (5 a 10 μm), podía abrirse o cerrarse mediante un émbolo que se aproximaba o retiraba mediante la acción de un electroimán. La microválvula fue ideada y construida especialmente para realizar estos experimentos (Bryant, Del Castillo, García, Gijón y Lee, 1967). Las respuestas eléctricas de la membrana se registraron con la técnica convencional de microelectrodos de vidrio. Los resultados mostraron que las descargas de microdosis de antígeno en el líquido ambiente de la preparación producían despolarización local con generación de potenciales de acción, a los cuales llamaron "potenciales de antígeno" (PA). Tanto la amplitud como el curso

temporal de la despolarización dependían de la distancia entre la punta de la micropipeta y la superficie celular en el sitio de la implantación del microelectrodo. Si la punta de la micropipeta estaba lejos de la superficie del músculo la reacción era pequeña, pero la despolarización aumentaba gradualmente en relación inversa a la distancia entre la punta de la pipeta y el músculo. Si la distancia era corta la despolarización llegaba a un nivel tal que se disparaban los potenciales de acción en el músculo. Por otra parte, la superficie de la fibra no mostró sitios especialmente sensitivos al antígeno, sino que su sensibilidad fue uniforme. Ellos dieron por hecho que solo existían unas cuantas células cebadas en el músculo diafragma denervado, y que la mayoría de las microdosis de antígeno causaban PA actuando directamente en las fibras musculares sensibilizadas, ya que de activar a las células cebadas, éstas deberían de haberse destacado como sitios de sensibilidad exquisita al antígeno. Por consiguiente, concluyeron que la presencia de estos PA graduales es prueba de un efecto directo del antígeno sobre las fibras musculares.

Más tarde Dale y Zilleti (1970) y Chand y Eyre (1978) criticaron esta conclusión sobre la base de que el diafragma del cobayo está "plagado" de células cebadas, y que los PA se produjeron probablemente como un efecto del antígeno sobre las células cebadas, con la subsecuente acción de mediadores locales tales como la histamina sobre el músculo. Aunque estos autores no dieron evidencia cuantitativa sobre esto y la referencia empleada para su aseveración fue equivocada, como se mencionó en el capítulo anterior, sus criterios son útiles porque ellos finalmente cuestionan si *¿hay suficientes células en el músculo diafragma para mediar la*

anafilaxia en las condiciones experimentales descritas por Alonso de Florida y cols, en 1968? En el presente capítulo se responde a esta pregunta.

Para abordar el problema, calculamos la probabilidad P , de que al menos $k \geq 1$ moléculas de antígeno puedan alcanzar al menos una célula cebada y activarla dentro del músculo. Una P alta debilitaría considerablemente la conclusión hecha por Alonso de Florida y cols. (1968) mientras que una P baja la apoyaría.

MATERIAL Y METODO

Para calcular P usamos la siguiente información: 1) los datos publicados por Alonso de Florida y cols (1968) sobre el área que abarca el antígeno y el tiempo de exposición al mismo; 2) los datos de densidad de células cebadas en el músculo esquelético denervado reportados en el capítulo anterior y 3) las medidas del coeficiente de difusión de los antígenos en el músculo.

Área abarcada por el antígeno y tiempo de exposición. El tiempo de exposición al antígeno se tomó como 0.5 seg., que fue el lapso en el cual la pipeta estuvo abierta en los experimentos de Alonso de Florida *et al.* (1968). El área cubierta por el antígeno durante este tiempo no se midió experimentalmente pero fue estimado por el diámetro interno de la punta de la pipeta (5 μm) y la difusión del antígeno en solución salina del baño (sección de resultados).

Densidad de células cebadas. Se usaron los datos de densidad reportados en el capítulo precedente, donde mostramos además que las células cebadas en el músculo

inervado son más numerosas en el tendón que en el músculo, pero después de la denervación crónica esta relación se invierte.

La densidad promedio de células cebadas encontrada en todo el músculo denervado fue de aproximadamente 175 cél/mm^3 , y de aproximadamente 304 cél/mm^3 la encontrada en la mitad del músculo entre sus sitios de inserción.

Coefficiente de difusión. Dado que el antígeno albúmina de huevo usado por Alonso de Florida y cols (1968) no es detectable histológicamente, en nuestros experimentos utilizamos ferritina, otra proteína que también puede actuar como antígeno. La posibilidad de observar las moléculas de ferritina directamente con el microscopio electrónico nos permitió la determinación exacta de la concentración de estas moléculas a varias profundidades dentro del músculo. Además, el hecho de que el radio de la molécula de ferritina es del mismo orden de magnitud que el de la molécula de albúmina de huevo, y también el hecho de que ambas proteínas son globulares, justifican las extrapolaciones en nuestros cálculos.

Con el fin de calcular el coeficiente de difusión de la ferritina en el músculo diafragma del cobayo se ideó la siguiente técnica: se obtuvo una tira del diafragma denervado del cobayo y se mantuvo en condiciones fisiológicas *in vitro*. Se colocó una pipeta de vidrio, cuyo diámetro interno en la punta medía $300 \mu\text{m}$, en contacto con la superficie del músculo, esta pipeta contenía una solución de ferritina a una concentración de 100 mg/ml . Se permitió la difusión de la ferritina en el tejido durante cuarenta minutos, momento en el que se detuvo al cambiar la solución fisiológica por fijador de Karnovsky más ferrocianuro al 10% durante 1 hora. El ferrocianuro sirvió

para marcar la ferritina. En seguida, de la zona marcada se obtuvo con un vibratomo una rebanada de tejido de 100 μm de espesor el cual se procesó para microscopía electrónica, luego se obtuvo un corte fino de aproximadamente 0.06 μm de espesor, perpendicular a la superficie del músculo sobre la zona donde se colocó la pipeta, del que se tomaron varias micrografías de baja resolución (6000 x) a través del tejido por el que se difundió la ferritina. La ferritina sólo difundió en el tejido conectivo sin pasar a las fibras musculares. Con estas micrografías se construyó un "mosaico" que muestra el camino de difusión de la ferritina a lo largo del tejido conectivo (Fig. 2.1).

Una vez localizado este camino de difusión se tomaron micrografías de mayor resolución (24000 x) a diferentes distancias, desde la superficie del músculo y a lo largo del camino de difusión de la ferritina (ejemplos en Figs. 2.2A, B y C).

Para determinar la concentración de moléculas de ferritina, esto es, el número de moléculas contado en un volumen dado en el tejido conectivo del músculo; se marcó una retícula en las micrografías de mayor resolución (24000x); el volumen en cada caso se calculó multiplicando el área de la retícula por el espesor del corte de tejido: $0.16 \mu\text{m}^2 \times 0.06 \mu\text{m} = 0.01 \mu\text{m}^3$. Se contaron las moléculas de ferritina en nueve cuadros de la retícula, se escogieron sistemáticamente tres cuadros en la parte superior, tres en la parte media y tres en la parte inferior de cada fotografía como se muestra en la Fig. 2.2C. De estas cuentas se sacaron promedios y se calculó la concentración.

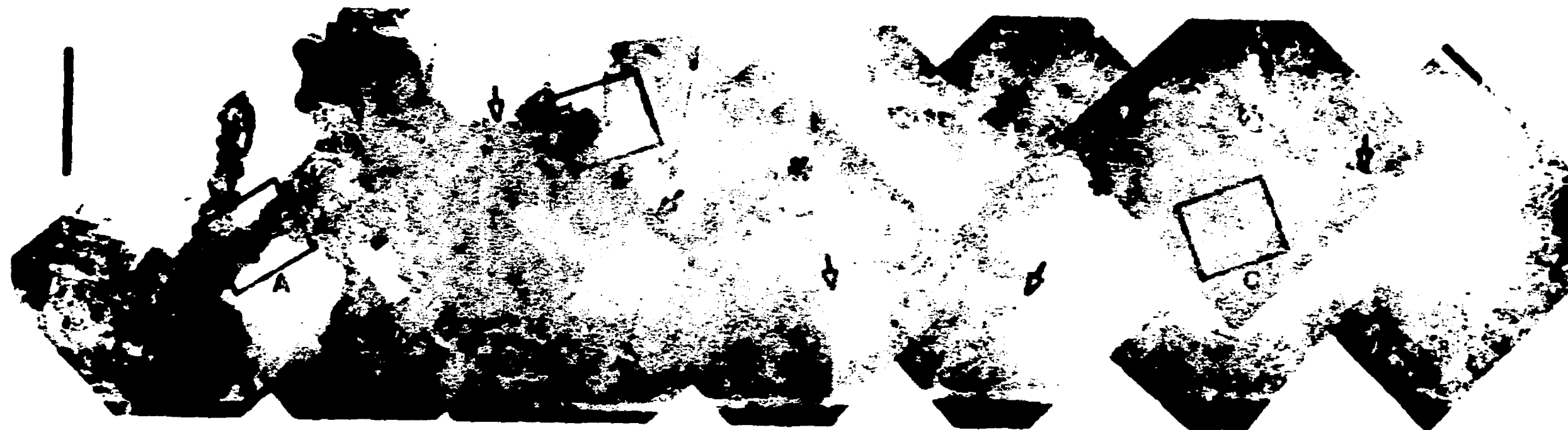


Figura. 2.1. "Mosaico" formado por micrografías de baja resolución (6000x) del músculo diafragma denervado. Se distingue la sección transversal de tres fibras musculares marcadas por los asteriscos situados en la parte media de cada fibra. Las flechas indican el camino por el que se difundió la ferritina. La punta de la micropipeta cargada con ferritina (100mg/ml) se puso en contacto con la superficie del músculo en el extremo izquierdo del mosaico durante 40 min. Las moléculas de ferritina no son visibles a esta resolución. Los rectángulos marcados con A, B y C corresponden a tres sitios donde se tomaron micrografías de mayor aumento que se muestran en la figura 2.2. Además se tomaron otras micrografías de alta resolución que sirvieron para determinar el gradiente de concentración mostrado en la figura 2.3. Calibración 16 μm . (Tomada de Sánchez-Mejorada *et al.* 1994).

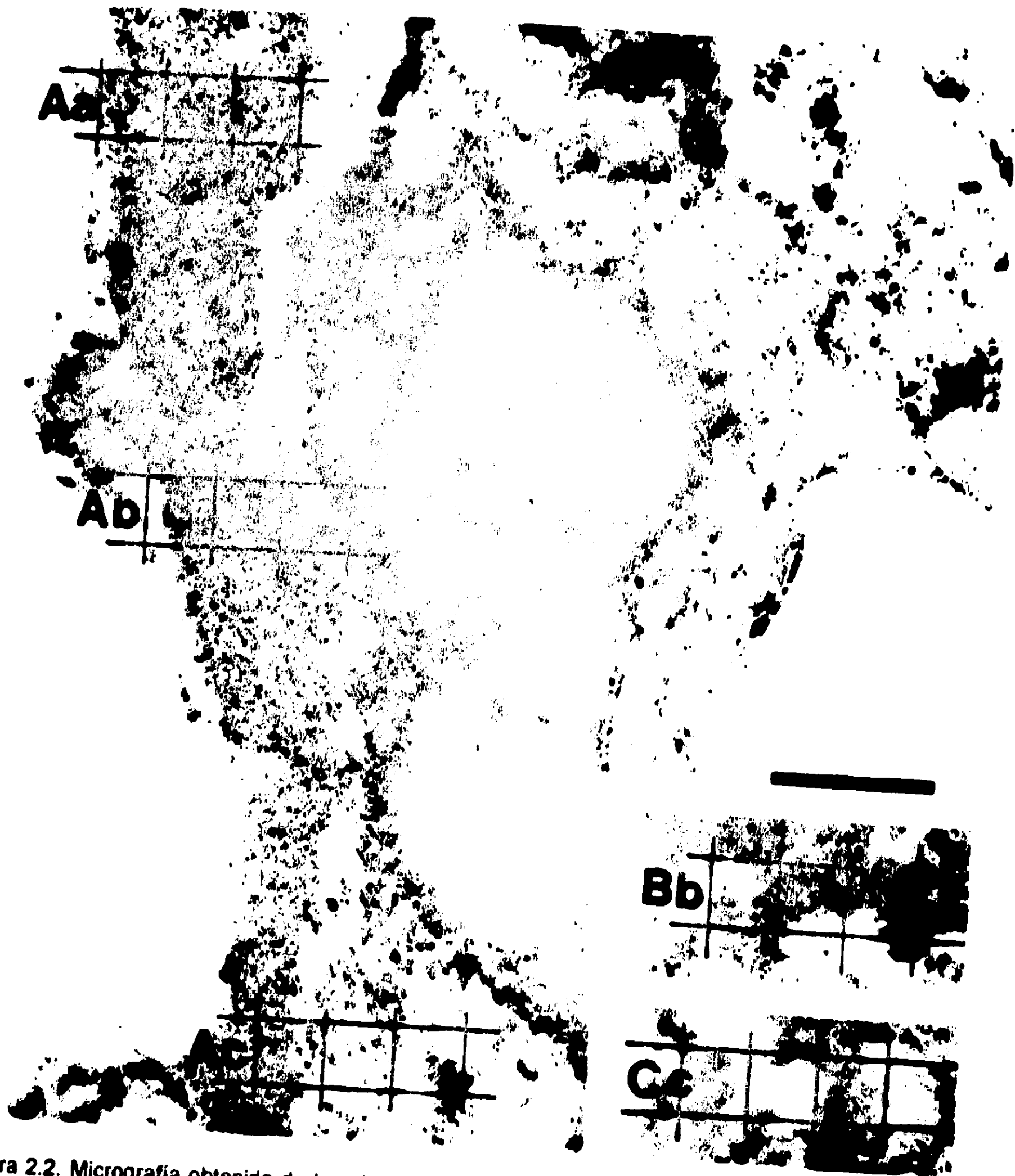


Figura 2.2. Micrografía obtenida de los sitios A, B y C mostrados en la Fig. 2.1. Se marcaron tres cuadrados adyacentes en la parte superior, media e inferior a lo largo del tejido en el que difundió la ferritina. Estos cuadrados se muestran, como Aa, Ab y Ac. Cuadros semejantes se superpusieron sobre las micrografías (no mostradas) de los recuadros B y C de la figura 2.1. Se muestra un acercamiento de los cuadrados de la parte media de la micrografía B (Bb) y de la parte inferior de la micrografía C (Cc). Cada lado del cuadrado mide $0.416 \mu\text{m}$ en el tejido y equivale a 1 cm en la micrografía. Las micrografías de los cuadros fueron obtenidas a las siguientes profundidades: Ab, $26.6 \mu\text{m}$; Bb, $76.6 \mu\text{m}$; Cc, $139.9 \mu\text{m}$. Con esta amplificación se distinguen claramente las moléculas de ferritina así como el gradiente de concentración. Calibración: $1 \mu\text{m}$. (Tomada de Sánchez-Mejorada *et al*, 1994).

RESULTADOS Y MODELO MATEMATICO

Coefficientes de difusión.

Ferritina. Para determinar la presencia de moléculas de ferritina y su gradiente de concentración en el tejido conectivo del músculo, se detectaron las moléculas individuales electrodensas en el microscopio electrónico de transmisión (ME). El procedimiento histológico desarrollado detecta los sitios del tejido donde el compuesto ha penetrado. Una cuenta directa de moléculas de ferritina al ME permitió la determinación exacta de su concentración a profundidades variables dentro del tejido.

En la Fig. 2.3 se muestran el gradiente de concentración de la ferritina a diferentes profundidades en el tejido conectivo del músculo y su ajuste con la ecuación de difusión (Crank, 1970):

$$C(x,t) = \frac{C_0}{\sqrt{\pi Dt}} \int_x^\infty \exp(-\xi^2 / 4Dt) d\xi \quad (1)$$

donde $C(x,t)$ es la concentración de la ferritina a una profundidad x al tiempo t ; D es el coeficiente de difusión y C_0 es la concentración inicial de ferritina sobre la superficie del músculo. Del ajuste de la ecuación (1) a los datos experimentales podemos obtener el coeficiente de difusión D de la ferritina en el tejido conectivo: $D=0.56 \mu\text{m}^2 / \text{seg}$.

Albúmina de huevo. Dado que los antígenos ferritina y albúmina son globulares y sus radios son del mismo orden de magnitud, podemos usar la ecuación (2) (Einstein,

1956) para calcular el coeficiente de difusión de la albúmina de huevo a partir del valor obtenido para la ferritina.

$$D = \frac{RT}{N} \frac{1}{6\pi\eta\rho} \quad (2)$$

donde R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, N es el número de Avogadro, η el coeficiente de viscosidad del solvente, y ρ el radio de las moléculas de soluto. Así, despejando η de la ecuación (2) y utilizando los valores del radio de la molécula de ferritina (Munro y Linder, 1978) $\rho_f = 6.25 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ y el coeficiente de difusión para la ferritina, $D_f = 0.56 \mu\text{m}^2 / \text{seg}$. obtenemos:

$$\eta = \frac{RT}{N} \frac{1}{6\pi D_f \rho_f}$$

Por tanto, de la sustitución de η y del radio de la molécula de albúmina de huevo (Bull, 1941) $\rho_a = 2.72 \times 10^{-3} \mu\text{m}$ en la ecuación (2) obtuvimos el coeficiente de difusión de la albúmina de huevo $D_a = 1.29 \mu\text{m}^2 / \text{seg}$.

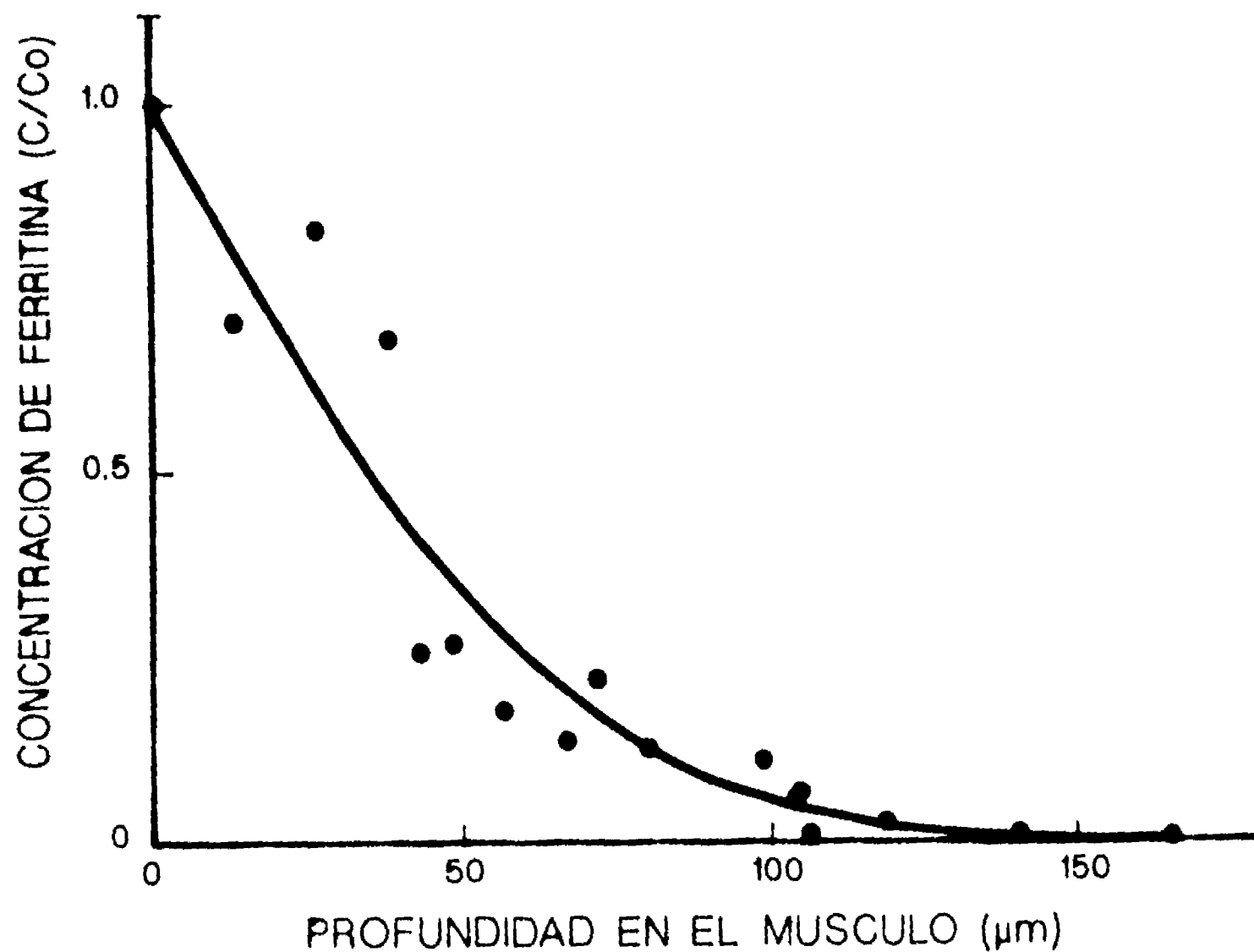


Figura. 2.3. En las ordenadas se muestra el cociente de la concentración de ferritina a una profundidad dada (C) entre la concentración inicial (C_0). En las abscisas se indica la profundidad del músculo. El ajuste de la curva se hizo con la ecuación (1). (Tomada de Sánchez-Mejorada *et al.* 1994).

Probabilidades.

El modelo. Para calcular la probabilidad $Pr(X_V=x)$ de que las moléculas de antígeno en un espacio de volumen V dentro del tejido conectivo del músculo, alcancen un número X de células cebadas, después de una descarga de antígeno, aplicamos la ecuación (3). Por lo tanto, X_V tiene una distribución de Poisson:

$$\Pr(x_v = x) = \frac{(\lambda V)^x \exp(-\lambda V)}{x!} \quad x = 0, 1, 2, \dots \quad (3)$$

donde λ es la concentración de células cebadas en la tira de músculo.

Como una aproximación asumimos que el espacio de volumen V es un cilindro representado en la Fig. 2.4:

$$V = ha \quad (4)$$

donde h es la profundidad alcanzada por k moléculas de antígeno en este volumen dentro del lapso de tiempo requerido para desarrollar un PA, y a es el área de la superficie del músculo cubierta por el antígeno después de cada descarga independiente de antígeno. Una descarga de antígeno es una cantidad dada de antígeno que se difunde en el medio al abrir la micropipeta. Una "descarga independiente de antígeno" es tal que ninguna otra descarga de antígeno administrada durante el mismo experimento se sobreponga a la anterior. En estos experimentos la mayoría de las descargas fueron independientes, excepto cuando se buscaba la desensibilización. Ya que no conocemos la sensibilidad al antígeno en las células cebadas localizadas dentro del músculo, tomamos $k=1$ como primera aproximación. En otras palabras, asumimos que después de cada descarga de antígeno, una o más moléculas quedan contenidas en un volumen V , y que si el mecanismo mediado es el que induce los PA, una de estas moléculas de antígeno debería de ser suficiente para

disparar la liberación de suficiente mediador en al menos una célula cebada como para inducir un PA. Por otro lado, en el experimento de difusión de ferritina la punta de la pipeta fue puesta en contacto con la superficie muscular. Así que, para calcular la probabilidad mencionada, podemos asumir que después de cada descarga de antígeno se genera un PA de por lo menos 25% del tamaño máximo. Por lo tanto, la probabilidad de que al menos una célula cebada sea alcanzada por el antígeno en un volumen V , esta dada por:

$$P = 1 - \exp(-\lambda V) \quad (5)$$

Para este cálculo sería pertinente considerar sólo una fracción del volumen V , la que corresponde al tejido conectivo, y no la de las fibras musculares. Sin embargo, no es necesaria una corrección ya que el error se compensa porque, el volumen tomado en cuenta para las moléculas de antígeno es igual al considerado para las células cebadas. Para obtener el valor de h , necesitamos el coeficiente de difusión de los antígenos en el tejido conectivo. Para la ferritina, se determinó experimentalmente ajustando la ecuación (1) (Crank, 1970) al gradiente observado en las micrografías. En consecuencia, el parámetro h es la solución aproximada de la siguiente ecuación no lineal:

$$C(x, t_0) = \frac{k}{W} \quad (6)$$

donde $c(x,t)$ es la función de distribución (1), t_0 es el tiempo de exposición al antígeno en los experimentos de Alonso de Florida y cols (1968), y W es el volumen de una sola célula cebada. La concentración k/W asegura que una sola célula cebada es alcanzada por al menos k moléculas de antígeno.

En muchos experimentos la punta de la micropipeta fue puesta muy cerca de la superficie del músculo (Fig. 2.4). Bajo estas circunstancias asumimos que el área de la superficie del músculo cubierta por el antígeno es $a = \pi(r_1 + r_2)^2$ donde r_1 es el radio de la punta de la micropipeta, y r_2 es la distancia alcanzada por al menos una molécula de antígeno durante su difusión en el medio salino desde la micropipeta hasta la superficie del músculo.

Cálculos. Sabemos que $r_1 = 2.5 \mu\text{m}$ (Alonso de Florida *et al.*, 1968). Además, tenemos que r_2 es la solución de la ecuación (6) con el coeficiente de difusión del antígeno en agua $33.9 \mu\text{m}^2/\text{seg}$ y $77.9 \mu\text{m}^2/\text{seg}$ respectivamente para ferritina y albúmina de huevo y $t = 0.5 \text{ seg}$ (ver sección de métodos). Obtuvimos que $r_2 = 53.0 \mu\text{m}$ para la albúmina de huevo y $r_2 = 34.75 \mu\text{m}$ para la ferritina. Así, las áreas cubiertas respectivamente por las moléculas de albúmina de huevo y ferritina son $a = 9.6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ y $a = 4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

La profundidad h , alcanzada por el antígeno en el tejido conectivo calculado con la ecuación (6) con $t=0.5 \text{ seg}$, fue $h = 9.5 \mu\text{m}$ y $h = 4.48 \mu\text{m}$, respectivamente para albúmina de huevo y ferritina.

Con la ecuación (4) y conociendo los valores de h y a , obtuvimos $V=9.1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ y $V=1.9 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ como el espacio alcanzado con las moléculas de albúmina de huevo y ferritina, para el tejido durante 0.5 seg. Usando el volumen calculado y el promedio de la densidad de células cebadas en este músculo, aplicamos la ecuación (5) y obtuvimos $P=0.016$ y $P=0.004$, como las probabilidades de alcanzar al menos una célula cebada respectivamente con albúmina de huevo y ferritina. Si en lugar de usar el promedio de la densidad a lo largo del músculo tomamos la densidad más alta encontrada en la región media (304 cél/mm^3), las probabilidades son $P=0.03$ y $P=0.003$

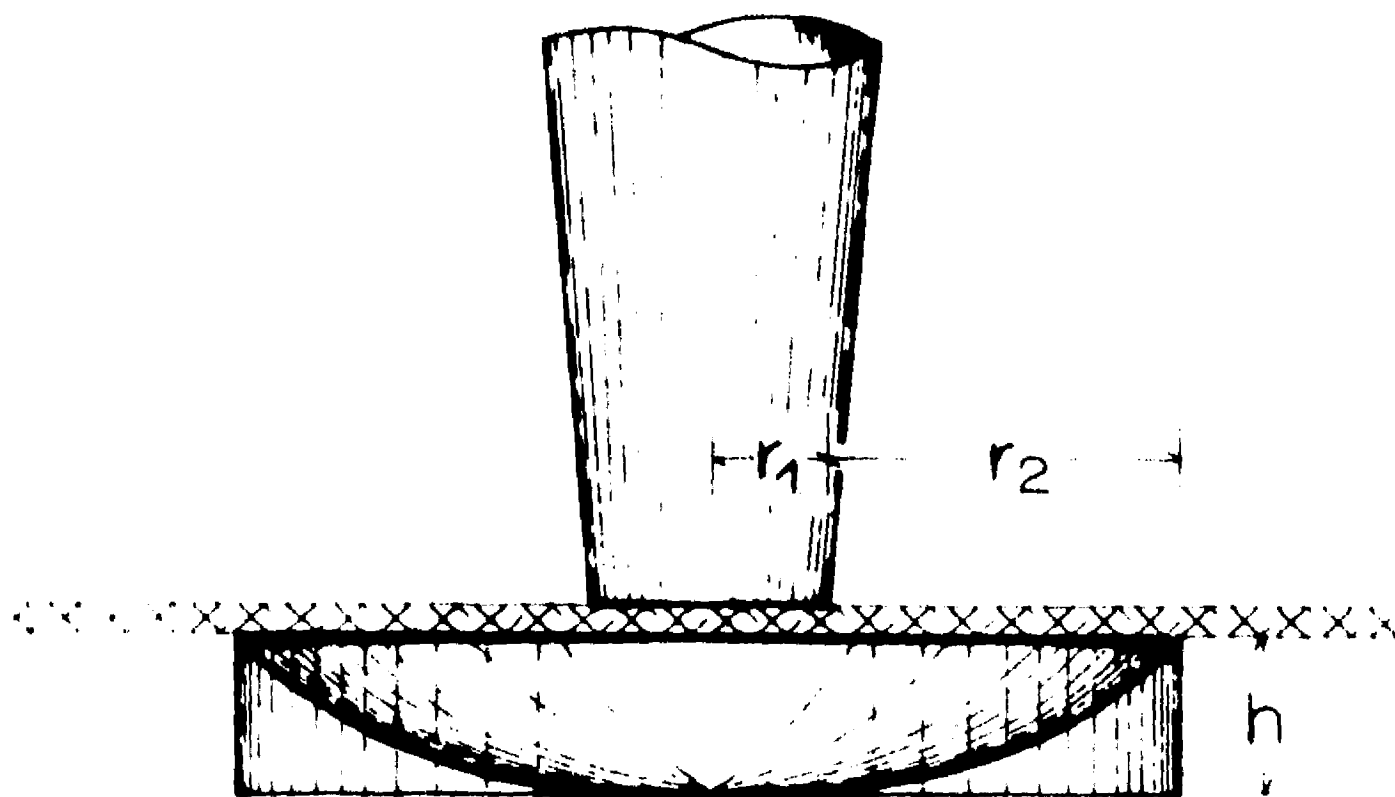


Fig 2.4 Representación de la punta de la pipeta en contacto con la superficie del músculo. Cuando la micropipeta se abre, el antígeno se difunde desde la punta de la micropipeta en dos direcciones: una hacia dentro del músculo alcanzando la profundidad h , y otra en la superficie del músculo alcanzando la distancia $r_1 + r_2$. Una representación simple del espacio alcanzado con las moléculas de antígeno durante un tiempo corto (0.5 seg.) es un cilindro de volumen aproximado $V=9.1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ y $V=1.9 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, respectivamente para las moléculas de albúmina de huevo y ferritina. (Tomada de Sánchez-Mejorada *et al.*, 1994).

Con la ecuación (4) y conociendo los valores de h y a , obtuvimos $V=9.1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ y $V=1.9 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ como el espacio alcanzado con las moléculas de albúmina de huevo y ferritina, para el tejido durante 0.5 seg. Usando el volumen calculado y el promedio de la densidad de células cebadas en este músculo, aplicamos la ecuación (5) y obtuvimos $P=0.016$ y $P=0.004$, como las probabilidades de alcanzar al menos una célula cebada respectivamente con albúmina de huevo y ferritina. Si en lugar de usar el promedio de la densidad a lo largo del músculo tomamos la densidad más alta encontrada en la región media (304 cél/mm^3), las probabilidades son $P=0.03$ y $P=0.003$

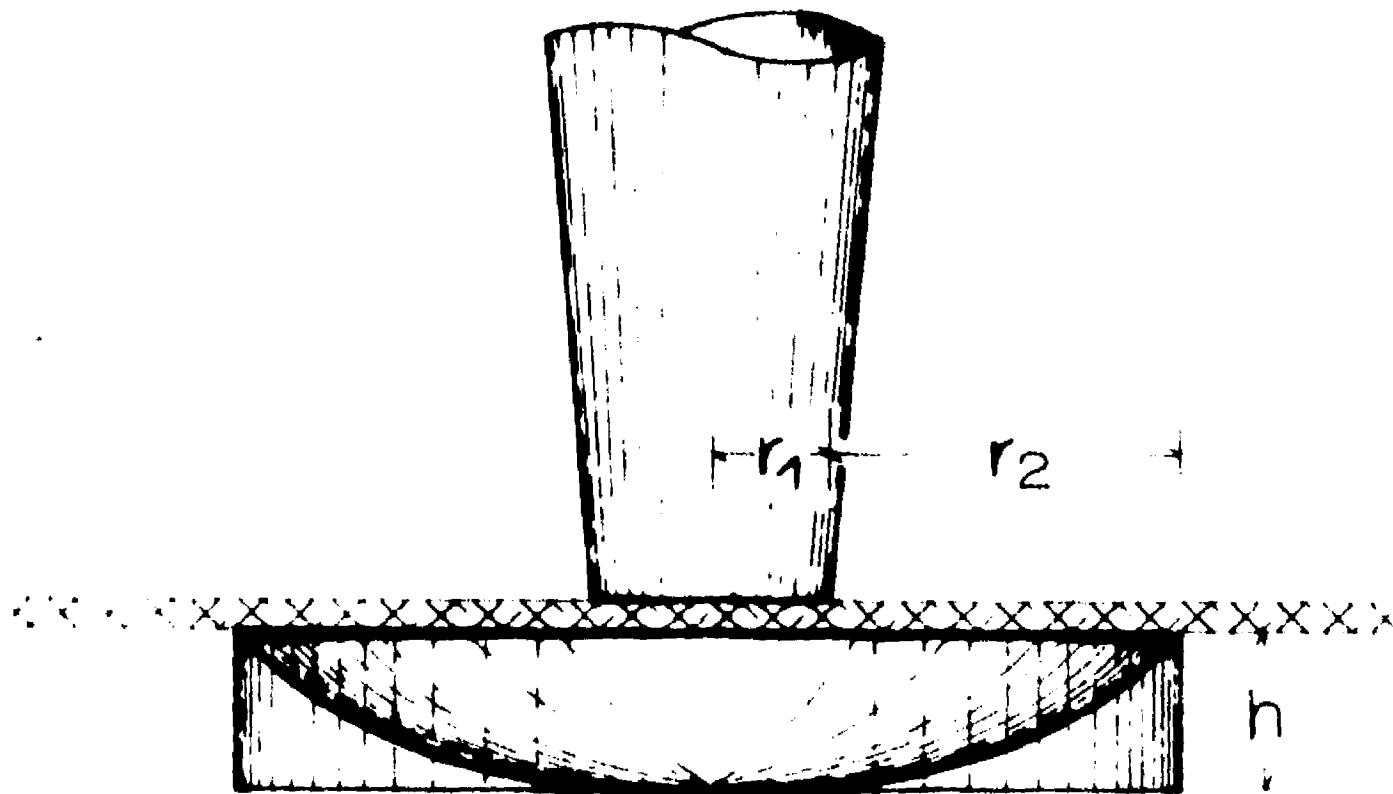


Fig 2.4 Representación de la punta de la pipeta en contacto con la superficie del músculo. Cuando la micropipeta se abre, el antígeno se difunde desde la punta de la micropipeta en dos direcciones: una hacia dentro del músculo alcanzando la profundidad h , y otra en la superficie del músculo alcanzando la distancia $r_1 + r_2$. Una representación simple del espacio alcanzado con las moléculas de antígeno durante un tiempo corto (0.5 seg.) es un cilindro de volumen aproximado $V=9.1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ y $V=1.9 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, respectivamente para las moléculas de albúmina de huevo y ferritina. (Tomada de Sánchez-Mejorada *et al.*, 1994).

DISCUSION

Los resultados presentados en este capítulo muestran que no hay suficientes células cebadas en el músculo esquelético denervado para explicar el efecto mediado, y por lo tanto la hipótesis del efecto directo se ve apoyada, ya que la mayoría de los PA observados reflejan un efecto directo del antígeno sobre las fibras musculares alergizadas. En particular, en lo que concierne a los experimentos de Alonso de Florida y cols (1968) con la micropipeta y albúmina de huevo, los cálculos de probabilidad presentados en este capítulo, indican que se tendrían que realizar 62 experimentos bajo las mismas condiciones para poder alcanzar una célula cebada con la descarga de antígeno desde la micropipeta y que además esta célula pudiera liberar suficiente histamina (y otros mediadores) para provocar un PA. Esto apoya las observaciones hechas en los experimentos con la micropipeta, ya que cuando había una distancia adecuada entre la punta de la micropipeta y la superficie del músculo, se producía un potencial de acción cada vez que el antígeno se descargaba sobre la superficie del músculo.

Se podrían haber aplicado modelos más refinados para obtener cálculos de probabilidad más exactos con respecto a la hipótesis probada. Sin embargo, el usado aquí fue suficiente porque las probabilidades calculadas son muy bajas, y cualquier mejoramiento conduciría a probabilidades aún menores. El modelo usado es, en efecto conservador en los siguientes puntos:

1. Calculamos la probabilidad usando el coeficiente de difusión de la ferritina medido en el tejido conectivo del músculo. Pero, aun si la difusión fuera

mucho más rápida, la probabilidad obtenida seguiría siendo muy baja. Por ejemplo, tomando los coeficientes de difusión de la albúmina de huevo y de la ferritina en el músculo, como si fueran en el agua, las probabilidades serían $P=0.085$ y $P=0.026$ respectivamente, probabilidades todavía bajas.

2 Asumimos que el antígeno descargado por la micropipeta se limitó a un cilindro de base a y altura h dentro del músculo. Pero una representación más realista sería un volumen como el que se representa en la figura 2.4, así el número de células cebadas en un volumen V disminuye y como consecuencia disminuye la probabilidad calculada

3. También asumimos que todas las respuestas fueron provocadas con la punta de la micropipeta muy cerca de la superficie del músculo, pero de hecho los PA se pueden inducir con descargas originadas a varias distancias de la superficie del músculo. Y así, entre mayor es la distancia, la probabilidad de alcanzar una célula cebada es menor, ya que la concentración inicial del antígeno en la superficie del músculo también disminuye y sería menor que la que usamos en los cálculos

4 En los cálculos usamos el dato del promedio de la densidad de células cebadas, pero en vista de la poca profundidad alcanzada por el antígeno después de cada microdosis, una situación más realista sería utilizar el promedio de la densidad de células cebadas sólo en el epimisio el cual es menor y así disminuye la probabilidad.

5 Consideramos que una sola molécula de antígeno puede hacer que una célula cebada libere suficiente mediador para causar un PA; $k = 1$ Esto puede ser verdad en los sistemas alérgicos naturales, pero en lo que se refiere al modelo experimental usado, este puede ser 10^6 veces menos sensible (Lichtenstein, 1968). lo cual implica una probabilidad extremadamente baja.

6 Sugerimos que el número de moléculas de antígeno que le pegan a la superficie de las células cebadas ($k = 1$) durante la descarga es el mismo que el número de moléculas que se unen al anticuerpo. No obstante, si consideramos la ley de acción de masas, el número de moléculas de antígeno combinadas con el anticuerpo debe ser menor que las moléculas que le pegan a la superficie de las células. Esta consideración también implica una probabilidad menor que la calculada.

Como se vé, todas estas consideraciones fortalecen la hipótesis del efecto directo en la anafilaxia del músculo. El hecho de que los potenciales de antígeno se asocian con la reducción de la resistencia de la membrana muscular similar a la causada por la acetilcolina sugiere que los antígenos provocan un cambio en la permeabilidad de la membrana muscular.

Es clara la importancia de la noción del efecto directo en la medicina, ya que por analogía, uno podría esperar un efecto directo también en el músculo liso, estructura envuelta en las reacciones alérgicas. Por otro lado esta noción sugiere un enfoque diferente en el desarrollo farmacológico al lado de las investigaciones sobre antihistamínicos. Los antihistamínicos no son tan específicos como

usualmente se piensa (Meyers, Jaweta y Goldfien, 1980) y pudieran bloquear parcialmente un efecto directo en el músculo liso.

CAPITULO 3

LOCALIZACION DE SITIOS DE UNION PARA IgG EN EL MUSCULO

LISO DEL COBAYO

INTRODUCCION

La anafilaxia puede producirse en tejidos o en células *in vitro*, tales como el músculo liso (Dale, 1920), cardíaco (Austen y Humphrey, 1963), esquelético (Alonso de Florida *et al.*, 1968) y el nervio (Ninomiya *et al.*, 1972). Douglas (1975) ha postulado que también las células secretoras liberan sus productos inducidos por la interacción antígeno-anticuerpo. Como ya se dijo en los capítulos anteriores para explicar este fenómeno se han postulado mecanismos de acción directos e indirectos (Alonso de Florida, 1976).

En el mecanismo directo se propone que el antígeno interactúa con los anticuerpos incorporados a las células blanco sensibilizadas, produciendo una respuesta. Así, si la célula en cuestión es una célula secretora producirá secreción, si es una fibra muscular producirá contracción, si es un capilar dará lugar a cambios en la permeabilidad, etc. La teoría de la membrana o del efecto directo, en cuanto al músculo liso se refiere, no es nueva, ya Dale en 1920 había sugerido que el antígeno específico inducía la contracción de las células de músculo liso sensibilizadas, a través de una acción directa sobre la membrana excitable.

Los trabajos clásicos sobre anafilaxia sostenían que las células alergizables se limitaban a los mastocitos y los basófilos. Sin embargo, hoy se sabe que una variedad de células pueden ser sensibilizadas mediante anticuerpos. Así la unión

de las inmunoglobulinas a través de su fracción Fc a los receptores de la membrana de distintas células del sistema inmune activa funciones fisiológicas tales como proliferación, fagocitosis y liberación de mediadores químicos (Kinet, 1989) Estos receptores Fc están también involucrados en varios procesos patológicos principalmente en las alergias y enfermedades autoinmunes (Henson, Henson, Fittschen, Kimani, Biatan y Riches, 1988). Y en efecto, cada vez existe más evidencia experimental de que este fenómeno se presenta también en las reacciones alérgicas, así se tiene que. (a) la acción del antígeno específico sobre la superficie de las fibras sensibilizadas del músculo esquelético (Alonso de Florida *et al.*, 1965a y b, 1968, 1980, Gutiérrez López y Alonso de Florida, 1980) y del músculo liso (Guschin, 1976) produce la contracción del músculo *in vitro*; (b) la administración *in vitro* del antígeno modifica el potencial de membrana y el potencial de acción de los nervios sensibilizados (Ninomiya *et al.*, 1972); (c) la interacción del antígeno con las inmunoglobulinas reagínicas (IgE) en los mastocitos y basófilos induce la secreción de mediadores farmacológicos a través de la agregación de receptores Fc (Ishizaka e Ishizaka, 1971, Anderson, Storch y Uvnas, 1973 Austen, Wasserman y Goetzi, 1976; Metzger, 1976); (d) los fragmentos Fc de la IgG₁ (principal inmunoglobulina reagínica en el cobayo) producen cambios del potencial de membrana en células aisladas de músculo liso (Souhrada y Souhrada, 1993); (e) la interacción Ag-Ac produce la contracción de células aisladas de músculo liso (Nemoto y Okamura, 1992).

Como otra evidencia de la unión de las IgG a las membranas celulares, en este capítulo presentamos datos morfológicos, obtenidos con técnicas inmunocitoquímicas, del pegado de las inmunoglobulinas reagénicas (IgG) a la membrana plasmática de células de músculo liso de la *taenia coli* del cobayo. Los resultados mostraron que las inmunoglobulina reagénicas se pegan a la membrana basal del músculo, con lo que se sustenta fuertemente la hipótesis del efecto directo

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron cobayos de la cepa Hartley de 300 g de peso, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical, mediante un golpe en la nuca. En seguida se perfundió el sistema circulatorio con solución salina isotónica de Ringer-Krebs a pH de 7.4 que contenía 145.0 mM de NaCl, 5.92 mM de KCl, 1.18 mM de KH_2PO_4 , 24.88 mM de NaHCO_3 , 1.27 mM de CaCl_2 , 1.18 mM de MgSO_4 . Para perfundir se cortó la punta del corazón y se canuló la arteria aorta a través del ventrículo izquierdo con el fin de lavar toda la sangre de los tejidos. Inmediatamente después de la perfusión se extrajo la cintilla del colon (*taenia coli*) y se colocó en solución de Krebs-Ringer oxigenada y mantenida a 37°C.

El tejido se sensibilizó pasivamente *in vitro* incubándolo a 37°C durante 3 horas con suero hiperinmune de conejo anti-seroalbumina bovina (BSA) en solución salina de Ringer-Krebs. La concentración de anticuerpo a la que se expusieron los tejidos fue de 13µg/ml

Se hicieron registros de tensión, como control, para verificar la respuesta del músculo sensibilizado al antígeno específico (BSA). Los tejidos se colocaron en cámaras de órgano aislado con solución de Ringer-Krebs, sujetando un extremo de la preparación a la base de la cámara y el otro a un transductor de tensión isométrica. Las preparaciones se mantuvieron a temperatura constante de 37°C y se burbujearon continuamente con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂. Las contracciones isométricas se registraron en papel con un oscilógrafo de plumilla a través de un amplificador de DC. La viabilidad del tejido se probó con la respuesta a la histamina (10 µg/ml) administrada antes y después de la administración del antígeno específico. Luego los tejidos se fijaron por inmersión durante 24 horas en paraformaldehído al 4% y se sometieron a la técnica de inmunocitoquímica para marcar, ya sea con fluorescencia o con peroxidasa (horse radish peroxidase [HRP]), las IgG reactivas a BSA.

Para fluorescencia, después de fijado el tejido se pasó a sacarosa al 30% y luego en un crióstato se obtuvieron cortes de 10 µm. Se colectaron en laminillas gelatinizadas y se incubaron con suero de cabra 1:10 por 2 horas. Se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a isotiosianato de fluoresceína (Sigma 1/50) por 2 hr. Se lavaron con amortiguador de fosfatos y se montaron con glicerol 2:1 en H₂O. Finalmente se observaron en un sistema de epifluorescencia de un microscopio Nikon Optiphot. Para la marca de inmunoperoxidasa, el tejido se cortó en un vibratomo en secciones de 30 µm las cuales fueron procesadas por flotación en camaritas *ad hoc*. Se incubaron por 2 hr con un anticuerpo monoclonal

de rata biespecifico que reconoce a la IgG de conejo y a la HRP (Medicorp) 1/50; seguido de HRP 5µg/ml por 90 min, finalmente la HRP se reveló con diaminobenzidina al 0.1% y H₂O₂ al 0.005%. Algunos cortes se recogieron en laminillas, se deshidrataron y montaron con permount (Sigma) para su observación en el microscopio Nikon arriba mencionado. En caso de encontrarse marca, el resto de los cortes se procesaron para microscopía electrónica, con O₃O₄ al 1% por 20 min deshidratación con concentraciones crecientes de alcohol y óxido de propileno impregnación con resina epóxica e inclusión en plano con la misma resina entre dos cubreobjetos de plástico. De esta inclusión se seleccionó el corte del área de interés, el cual fue reincluido en bloques de epon, de donde posteriormente se obtuvieron cortes semifinos y finos; estos últimos después de contrastarse con acetato de uranilo y citrato de plomo se observaron en un microscopio electrónico Jeol 1001. Para ambos casos fluorescencia e inmunoperoxidasa, paralelamente se procesaron cortes control en los que se omitió la sensibilización pasiva o incubación con el suero hiperinmune anti BSA.

RESULTADOS

Con microscopía de luz se observaron marcas tanto de inmunofluorescencia como de inmunoperoxidasa que revelan la presencia de IgG en las fibras de músculo liso de la *taenia coli* del cobayo sensibilizada pasivamente. Al microscopio electrónico se confirmó la marca de inmunoperoxidasa de las IgG.

Localización por inmunofluorescencia de los anticuerpos reagínicos (IgG).

La inmunofluorescencia de las IgG se encontró tanto en la capa circular como en la capa longitudinal del músculo de la *taenia coli*, sensibilizada pasivamente con suero hiperinmune de conejo contra BSA. En la Fig. 3.1B se distingue claramente la marca intensa de inmunofluorescencia en las fibras de la capa circular principalmente en las que se encuentran en el borde del tejido. En la capa longitudinal esta marca se extiende desde el borde del tejido hasta unas 20 fibras hacia adentro también se distingue la marca en el tejido conectivo que rodea las fibras longitudinales que están en contacto con la capa circular. En la Fig. 3.1A se muestra el control, es decir, una sección de músculo no sensibilizado en el que no se encontró marca.

Localización de inmunoglobulinas reagínicas (IgG) con microscopía

electrónica. Se detectó la presencia de IgG en la *taenia coli* del cobayo mediante las marcas de inmunoperoxidasa. Se observó reacción positiva a la peroxidasa en la membrana basal de las fibras musculares. En la figura 3.2 se puede observar claramente la marca de peroxidasa en la membrana de varias fibras musculares, lo que revela la unión de las IgG a este nivel.

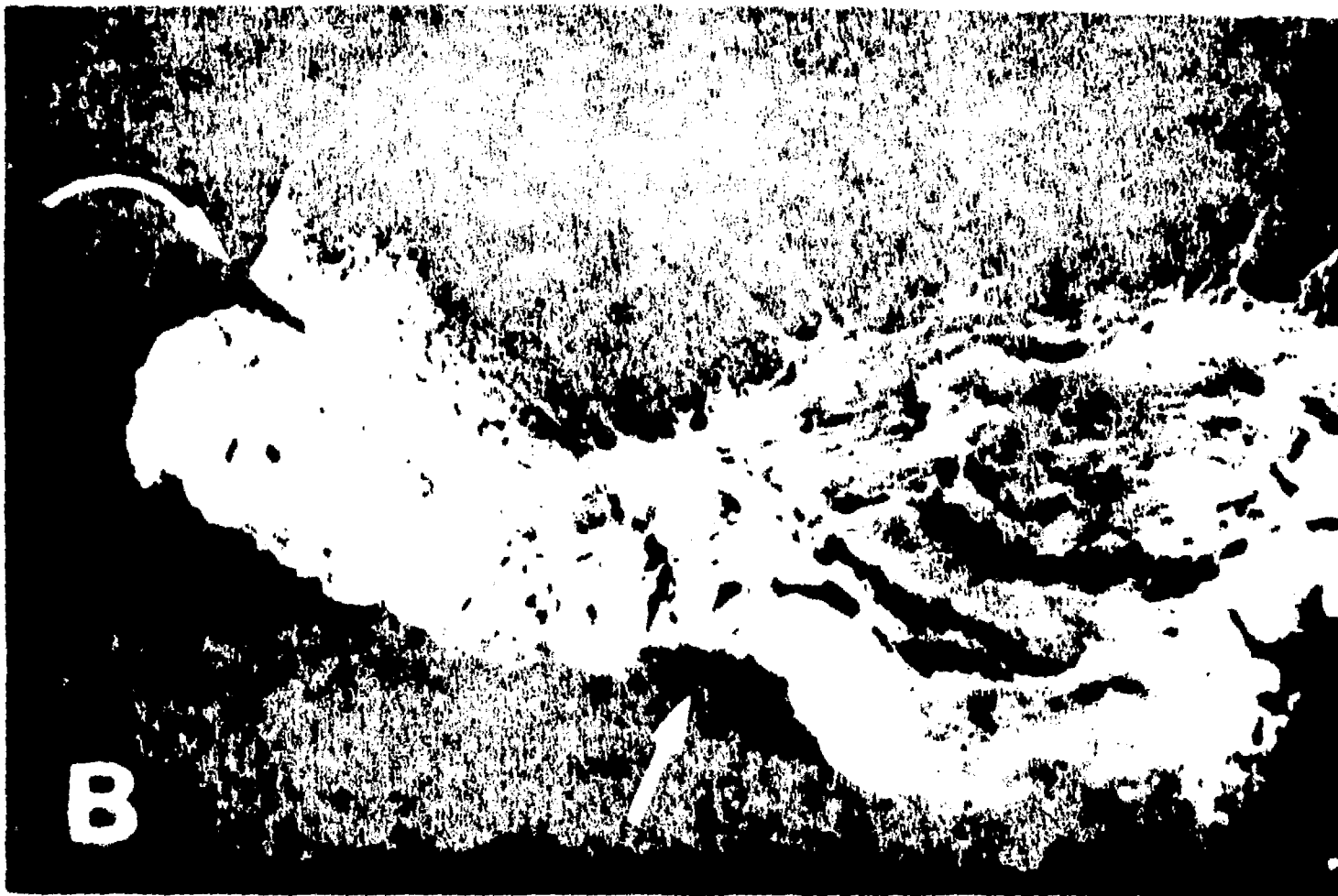
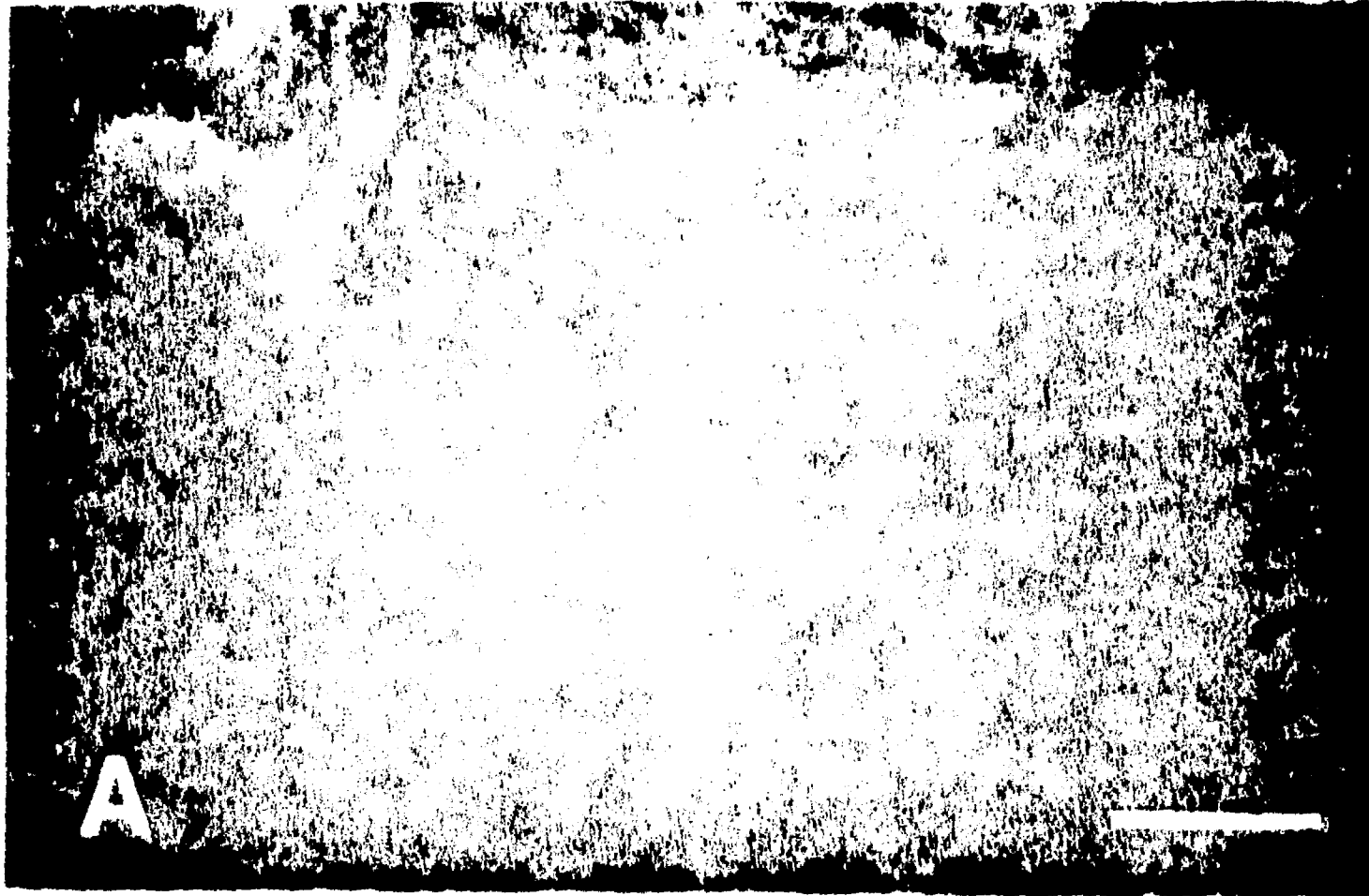


Figura 3.1. Fotomicrografía (10X) de una sección de 10 μm del músculo liso (*taenia coli*). **A.** Control (músculo no sensibilizado) en el que no se encontró marca de peroxidasa. **B.** Corte longitudinal de la *taenia coli* sensibilizada pasivamente mediante incubación con suero hiperinmune de conejo contra BSA y procesado por inmunofluorescencia. Se distinguen la capa longitudinal y la capa circular del músculo; nótese la marca intensa de inmunofluorescencia que revela la presencia de IgG sobre el músculo, tanto en las fibras de la capa longitudinal (flecha curva) como en las de la capa circular (flecha), misma que se extiende desde el borde externo del tejido hasta unas 20 fibras hacia adentro. Calibración: 50 μm .

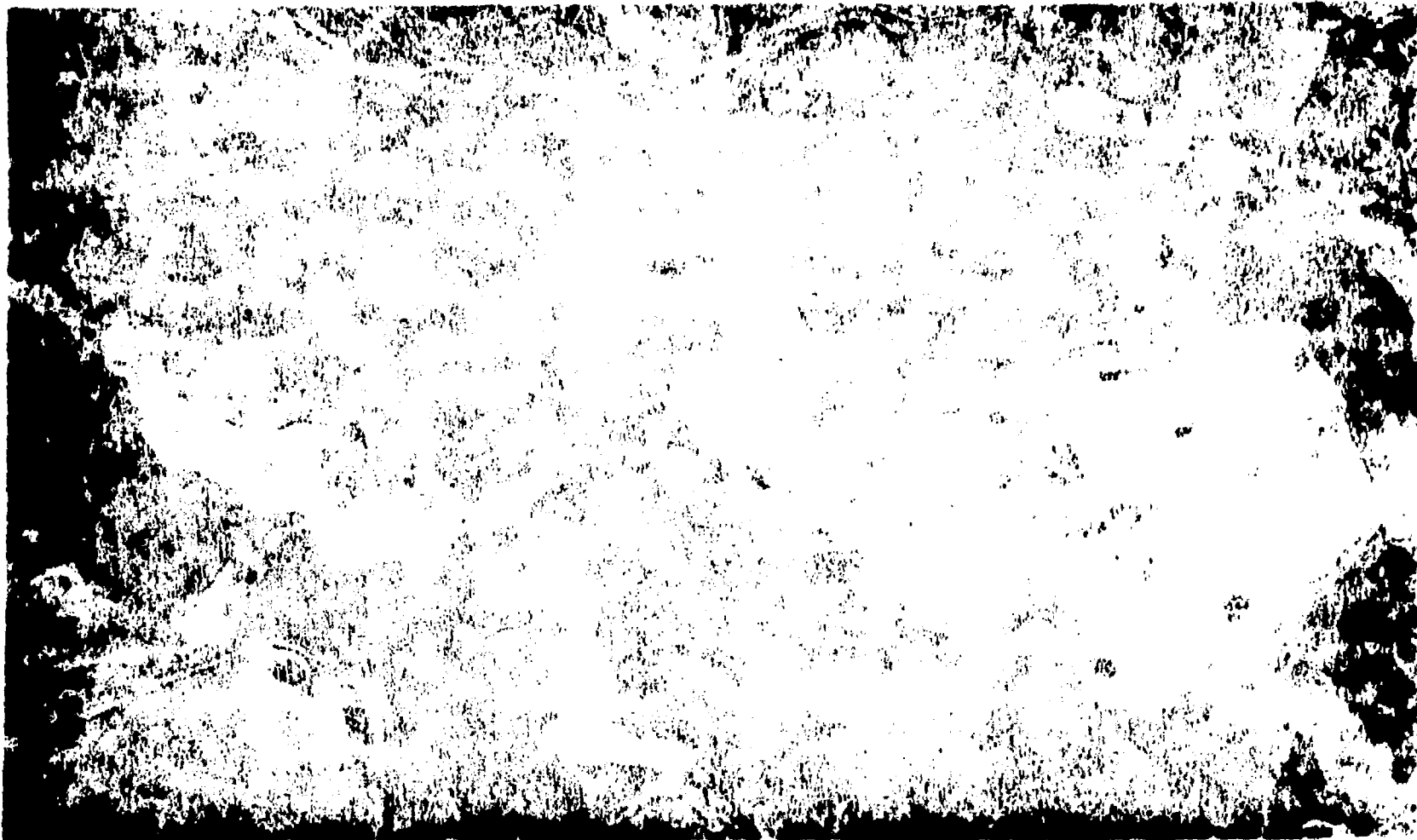


Figura 3.2. Electromicrografías del músculo liso de la *taenia coli* del cobayo procesado por inmunoperoxidasa para detectar anticuerpos reagínicos contra BSA. **A.** Músculo no sensibilizado. **B.** Músculo liso sensibilizado con suero hiperinmune de conejo contra BSA, donde se distingue la marca de peroxidasa en varias fibras (flechas) en aposición a la membrana celular. En el recuadro se muestra un aumento de la zona de la membrana celular señalada. Calibración A y B: 2 μm , recuadro 100 nm.

DISCUSION

Aquí confirmamos que el músculo liso de la *taenia coli* del cobayo sensibilizado pasivamente *in vitro*, con suero hiperinmune de cobayo contra BSA, se contrae en respuesta al antígeno específico (BSA). Y demostramos por medio de técnicas inmunocitoquímicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa la unión de inmunoglobulinas reagínicas a la membrana muscular.

El mecanismo por el cual las inmunoglobulinas reagínicas se unen a la membrana de las células musculares aún no es claro, pues podría ser a partir de receptores Fc en la membrana de las células o bien mediante un mecanismo de adsorción física que no necesita de receptores para llevarse a cabo (Feigen, Vurek, Irwin y Peterson, 1961).

Se sabe que existen sitios de unión específicos para inmunoglobulinas, esto es receptores Fc, en diferentes células con funciones inmunológicas como son las células cebadas, eosinófilos, basófilos, linfocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos alveolares (Delespesse, Sarfati, Hofstetter, Suter, Nakajima, Peleman, Lettellier, Kilchherr y Frost, 1988). Así mismo se han descrito receptores Fc para IgG en otros tejidos tales como la aorta (Kasukawa, Okada e Igari, 1980), espermatozoo (Sethi y Brandis, 1980), bazo (Lin, Racis, Higginbotham-Ford y Tanz, 1986) y fibras nerviosas periféricas (Vedeler, 1987). También se ha demostrado que la IgG se une por medio de su fragmento Fc a los receptores específicos de las fibras musculares esqueléticas (Aarli y Tonder, 1974).

En el músculo liso todavía no se ha demostrado la presencia de receptores Fc, sin embargo hay datos que sugieren que la sensibilización en este tejido se lleva a cabo también a través de los receptores Fc. Esto se infiere de los experimentos de Souhrada y Souhrada (1993) donde se observó que, durante la sensibilización pasiva *in vitro* de miocitos aislados de la tráquea del cobayo, se producen cambios en el potencial de membrana tanto cuando los miocitos se incubaron con IgG₁ pura o sólo con los fragmentos Fc de esta inmunoglobulina reagínica.

Por otro lado, se ha demostrado que la IgG induce *in vitro* contracción dosis-dependiente de las células aisladas de músculo liso, interactuando con la membrana plasmática a través de sus fragmentos F(ab)₂ (Bobo, Ammor, Magous, Mingard y Bali, 1993). Sin embargo estos experimentos se realizaron con células de conejo y se sabe que en este animal la inmunoglobulina reagínica es la IgE.

Considerando estos antecedentes podríamos especular que la unión de las inmunoglobulinas reagínicas (IgG) al músculo, observada en nuestros experimentos, se realiza por medio de su fracción Fc a receptores específicos (Fc) que se encuentran en la membrana plasmática.

Cualquiera que sea el mecanismo por el cual las inmunoglobulinas reagínicas se unen al músculo, nuestros resultados prueban la presencia de estos anticuerpos en la membrana de las células musculares lisas, lo que nos permite concluir que la interacción directa del complejo antígeno-anticuerpo sobre la

membrana muscular es, al menos en parte, la responsable de la reacción de Schultz-Dale.

DISCUSION GENERAL

En 1920 Dale postuló la hipótesis del mecanismo directo de acción del antígeno en la anafilaxia del músculo. Sugirió que las células del músculo liso son capaces de sensibilizarse por la unión del anticuerpo, lo que permite una acción directa del antígeno sobre ellas. Más tarde, él mismo abandonó esta teoría del efecto directo y postuló la teoría de la histamina de la anafilaxia del músculo liso (Dale 1952); Dale, encontró que la histamina era liberada por el tejido sensibilizado tratado con antígeno y que este compuesto aumentaba el efecto de contracción que producía el antígeno. Experimentos posteriores realizados en varios laboratorios dieron evidencia de la existencia de otros mediadores farmacológicos, además de la histamina, involucrados en la reacción de Schultz-Dale y otras reacciones de hipersensibilidad (Mongar y Schild, 1962; Schawrtz y Austen, 1984)

Varios autores (Alonso de Florida, 1964 y 1980; Schild, 1956 y 1979) indican que con los datos hasta ahora observados no se puede explicar la teoría del mediador. Las dificultades lógicas que encuentra esta teoría para explicar un cierto número de datos experimentales, se resumen en seguida: a) no siempre es posible establecer una correlación cualitativa, y en otros casos cuantitativa, entre las sustancias que se liberan, o la cantidad en que se liberan en un tejido determinado y por otra parte, la reactividad y sensibilidad farmacológica del tejido en cuestión a esas sustancias (Austen y Humphrey, 1963; Boreus y Westerholm, 1962); b) se adolece así mismo de una correlación temporal del curso del

desprendimiento de esas sustancias y la velocidad con que se produce la reacción anafiláctica (Paton, 1959; Alonso de Florida *et al*, 1968; Sánchez Mejorada y Alonso de Florida, 1994); c) se puede producir el bloqueo de la acción farmacológica de un supuesto mediador con el antagonista apropiado (Cristea y Suhaci, 1968; Hawkins y Rosa, 1956; Chand y Eyre, 1976; Joiner, Wall, Davis y Hahn, 1974 Souhrada y Souhrada, 1984) o de la taquifilaxia del propio mediador (Mongar y Schild, 1962, Schild, 1956; Joiner *et al*, 1974), sin que ello evite la respuesta anafiláctica de una manera completa, y finalmente d) el agotamiento del supuesto mediador por medio de agentes farmacológicos, como es el compuesto 48/80, no es capaz de abolir la reactividad a los agentes farmacológicos (Mongar y Schild, 1952; Chand y Eyre, 1976). Dadas estas inconsistencias, resulta lógico regresar a la hipótesis del efecto directo propuesta en un principio por Dale para explicar la anafilaxia.

En su trabajo de 1968 Alonso de Florida y cols. llegaron a los primeros resultados que sustentan los postulados del mecanismo directo del antígeno en la anafilaxia del músculo. Demostraron que el antígeno específico producía cambios en el potencial eléctrico de las células musculares del diafragma denervado y sensibilizado. Estos resultados fueron refutados por Dale y Zilleti (1970) y Chand y Eyre (1978), arguyendo que esta estructura es rica en células cebadas y que los potenciales de antígeno producidos con la micropipeta son inducidos por la histamina que liberan estas células por la interacción antígeno-anticuerpo. Los resultados presentados en esta tesis muestran que el número de células cebadas

encontrado en el músculo esquelético denervado del cobayo no es suficiente para liberar la cantidad de histamina necesaria para producir la respuesta de Schultz-Dale. Además, demostramos que la probabilidad de alcanzar las células cebadas con una descarga de antígeno en condiciones como las de los experimentos de Alonso de Florida y cols. (1968) es insignificante, esto es, se necesitaría realizar 62 experimentos para alcanzar una sola célula cebada. Estos resultados validan las conclusiones de Alonso de Florida y colaboradores y apoyan fuertemente el mecanismo directo de acción del antígeno sobre las células musculares en esta estructura.

También se sabe que en el músculo esquelético denervado, la histamina puede inducir contracciones lentas pero intensas y que los antihistamínicos pueden bloquear solo parcialmente la reacción de Schultz-Dale en este tejido (Alonso de Florida *et al*, 1965; Sánchez-Mejorada y Alonso de Florida; observaciones sin publicar). Por lo tanto, se puede sugerir que en la reacción de Schultz-Dale del músculo esquelético participa también, al menos en parte, un mecanismo indirecto mediado por la histamina.

Por otro lado, en el músculo liso también existen datos que apoyan la hipótesis del efecto directo. Así, los resultados que reportamos en esta tesis encontrados en el músculo liso de la tráquea apoyan esta idea, ya que, la densidad de células cebadas encontrada es muy baja y la cantidad de mediador que pueden liberar no es suficiente para explicar la respuesta de Schultz-Dale. Además Souhrada y Souhrada (1984) reportaron que la sensibilización pasiva *in vitro*

produce hiperpolarización del músculo liso traqueal y que ésta no se puede evitar con antagonistas de los mediadores de la anafilaxia. En 1993 estos mismos autores reportan que la sensibilización de miocitos aislados de la tráquea, induce cambios en las propiedades de la membrana similares a los observados en el tejido entero, y que estos cambios son inducidos por la unión de las inmunoglobulinas reagénicas (IgG) a receptores Fc en la membrana.

De igual manera, los datos que encontramos en la *taenia coli* del cobayo, demuestran la unión de las IgG a la membrana de las células musculares. Estos datos sustentan fuertemente la presencia de un mecanismo directo de acción en este músculo. En este mismo sentido, recientemente Nemoto y Okamura (1992) demostraron que las células disgregadas de músculo liso de la *taenia coli* del cobayo, sensibilizadas pasivamente con anti-albúmina de huevo (fracción IgG), se contraen en respuesta al antígeno específico. Sugieren que la interacción del antígeno con la IgG unidas a la membrana de las células de músculo liso generan una señal que se transmite a los elementos contráctiles intracelulares vía el sistema de transducción que envuelve a la proteína G y que, la fosfolipasa-C parece ser el efector para la contracción anafiláctica en este sistema. Sin embargo, ellos utilizaron células en suspensión disgregadas enzimáticamente para realizar sus experimentos, y esta preparación contiene otras células además de las musculares, tales como células nerviosas, células epiteliales, células cebadas, neutrófilos y fibroblastos que podrían liberar mediadores que interfirieran con los cambios observados por estos investigadores.

Por otra parte también hay que aceptar que los datos hasta ahora aportados son insuficientes para sustentar de modo terminante la existencia de un mecanismo directo. La razón de esta última situación es que los tejidos utilizados son complejos; están constituidos por múltiples especies celulares, incluidas las células cebadas, y entonces cualquier argumento en apoyo de un efecto directo suele invalidarse invocando hipótesis *ad hoc* que defienden la liberación de autacoides mediante la acción del antígeno en las células cebadas o en otras fuentes.

En resumen se puede concluir que la reacción de anafilaxia o alergia experimental del músculo tanto esquelético denervado como liso resulta de la acción conjunta de los mecanismos directo y mediado.

La manera en la que las inmunoglobulinas reagínicas se unen a la membrana de las células musculares y la forma en que se genera la señal transmembrana que induce la contracción muscular alérgica son cuestiones que habrá que responder en futuras investigaciones.

REFERENCIAS

- Aarli J.A. and Tonder O. (1974): Fc Binding of IgG to skeletal muscle tissue. **Int. Arch. Allergy.**, **47**: 273-284.
- Aloe L. and Levi-Montalcini R. (1977): Mast cell increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. **Brain Res.**, **133**: 358-366
- Alonso-deFlorida F. (1964): Ideas sobre excitación celular en la anafilaxia. **Gac. Méd. Méx.**, **94**:1027-1040
- Alonso-deFlorida F. (1976). Estudios acerca de alergia experimental. **Gac. Méd. Méx.**, **112(4)** 277-291
- Alonso-deFlorida F. (1980). Membrane-receptor mechanisms in anaphylaxis. In: Larraide C, Wilms K, Ortiz-Ortiz L. and Sela M. (Eds.), **Molecules, Cells and Parasites in Immunology** Academic Press, New York.
- Alonso-deFlorida F. and Del Castillo A. (1977). The *in vitro* effects of calcium and potassium in resensitization of tracheal smooth muscles of allergized guinea pig. **Inter. Arch. Allerg. and Appl. Immunol.**, **55** 201-214
- Alonso-deFlorida F, Del Castillo J, García X. and Gijón E. (1968). Mechanism of the Schultz-Dale reaction in the denervated diaphragmatic muscle of the guinea pig. **J. Gen. Physiol.**, **51**:677-693.
- Alonso-deFlorida F, Del Castillo J, González C and Sánchez V. (1965a): Anaphylactic reaction of denervated skeletal muscle in the guinea-pig. **Science**, **147**:1155-1156.
- Alonso-deFlorida F, Del Castillo J, González C. and Sánchez V (1965b): On the pharmacological and anaphylactic responsiveness of denervated skeletal muscle of the guinea pig. **Brit. J. Pharmacol.**, **25**:610-620
- Amzel M. and Paljak, J (1977): Three-Dimensional structure of Immunoglobulins. **Ann. Rev. Resp. Immunol.**, **1**:39
- Anderson P, Storach S.A. and Uvnas B. (1973): Sequential exocytosis of storage granules during antigen-induced histamine release from sensitized rat mast cells *in vitro* an electron microscopic study. **Acta Physiol. Scand.**, **88**: 359-372.
- Austen K.F. and Humphrey J.H. (1963): *In vitro* studies of mechanism of anaphylaxis. **Advanc. Immunol.**, **3**:1.

Austen K.F, Wasserman S.I. and Goetzi E.J. (1976): Mast cell-derived mediators: structural and functional diversity and regulation of expression. In: Johansson S.G.O, Strandberg K, Uvnas B. (Eds.). **Molecular and Biological Aspects of the Acute Allergic Reaction**. Plenum Press, New York. pp 293-320.

Banks W.J. (1974) **Histology and comparative Organology: a Text-Atlas**. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Befus A.D, Pearce F.L, Gauldie J. and Horsewood P. (1982): Mucosal mast cells. I Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. **J. Immunol.**, **128**: 2475-2480.

Bienenstock J. (1988): An update on mast cell heterogeneity. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, **81**: 763-769.

Bienenstock J, Blennerhassett M, Tomioka M, Marshall J, Perdue M H. and Stead R H. (1989) Evidence for mast cell nerve interactions. In Goetzi E (ed.), **Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases**. New York.

Blackley C.H (1873) (Reprinted 1959). **Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (Hay fever or Hay asthma)**. Dawson's of Pall Mall, London

Bobo M.H, Ammor S, Magous R, Mingard P. and Bali J.P. (1993): Anti-stomach serum induces contraction of isolated smooth muscle cells from gastric antrum **Immunopharmacology**, **26(3)**: 241-247.

Boreus L.O and Westerholm. (1962): 5-Hydroxytryptamine in the Schultz-Dale reaction. **Acta Physiol. Scan.**, **56**: 17-25.

Bryant S.H, Del Castillo J, Garcia X, Gijón E. and Lee C.F. (1967): An electrically operated micro-tap. **Electroencephalog. Clin. Neurophysiol.**, **23**: 573.

Bull H.B. (1941). Osmotic pressure of egg albumin solutions. **J. Biol. Chem.**, **137**: 143-151

Capron A, Dessaint J.P, Capron, M. and Bazin H. (1975): Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Nature (London)**, **253**: 474-475.

Chand N. and Eyre P. (1976): Pharmacology of anaphylaxis in chicken intestine. **Br. J. Pharmac.**, **57**: 399-408.

Chand N. and Eyre P (1978). The Schultz-Dale reaction: A review. **Agents and Actions**, **813**: 171-184

Cherubini E, Ben Ari Y, Gho M, Bidard J N, Lazdunski M. (1987): Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus induced by a bee venom peptide. **Nature**, **328(2)**: 70-73.

Cirstea M and Suhaciu G. (1968): Role of histamine, substance P, slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) in the Schultz-Dale reaction of the guinea-pig ileum. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, **76**: 344-362.

Crank, J. (1970): **The mathematics of diffusion**. University Press, Oxford. p. 12.

Daffonchio L, Lees I. W, Payne A. N, and Whittle B. J. R. (1987). Pharmacological modulation of bronchial anaphylaxis induced by aerosol challenge in anaesthetized guinea-pigs. **Br. J. Pharmacol.**, **91**: 701-708.

Dale H.H (1913): The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea-pig. **J. Pharmacol. exp. Ther.**, **4**:167-223.

Dale, H.H. (1920) The biological significance of anaphylaxis. **Proc. Roy. Soc. B.**, **91**: 126-146

Dale H.H (1952): The mechanism of anaphylaxis. **Acta Allergol.**, **5**: 191-206.

Dale M.M and Zilleti J. (1970): The Schultz-Dale response of the longitudinal muscle strip preparation of guinea-pig ileum. **Br. J. Pharmacol.**, **39**:542-555.

Delespesse G, Sarfati M, Hofstetter H, Suter U, Nakajima T, Peleman R, Letellier M, Kilchherr E. and Frost H. (1988): Structure, function, and clinical relevance of the low affinity receptor for IgE. **Immunol. Invest.**, **17**:363-387.

Doerr R. (1929): Allergie und Anaphylaxie. In Kolle W. and Von Wassermann A. (Eds.), **Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen**. Fisher, Urban Schwarsenberg. Jena.

Douglas W.W. (1975): Autocoids (Chap. 5). In: Goodman L. S and Gilman A. (Eds.), **The pharmacological basis of therapeutics**. MacMillan, New York.

Douglas W.W. (1980): Histamine and 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) and their antagonists. In Goodman L. S. and Gilman A. (Eds.), **The pharmacological basis of therapeutics**. MacMillan, New York, pp 609-646.

Einstein A. (1956): **Investigations on the theory of the Brownian movement**. Dover Publications Inc., New York.

Feigen G.A, Vurek G.G, Irwin W.S, and Peterson J.K. (1961): Quantitative adsorption of antibody by the isolated heart and the intensity of cardiac anaphylaxis. **Cir. Res.**, **9**: 177.

Fisher R.A. (1950): **Statistical methods for research workers**. Hafner Publishing Company, New York, pp 78-113.

Foreman J.C. and Jordan C.C. (1984): Neurogenic Inflammation. **Trends Pharmacol. Sci.**, **5**: 116-119.

Froes M.M.Q, Kristmundsdottir F, Mahon M, and Cumming W.J.K: (1987): Muscle morphometry in motor neuron disease. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, **13**: 405-419

Galli S.J, Dvorak A.M, and Dvorak H.F. (1984): Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function. **Prog. Allergy**, **34**:1-141.

Ganguly A. K, Sathiamoorthy S.S, and Bhatnagar O.P. (1978). Effect of sub-diaphragmatic vagotomy on gastric mucosal mast cell population in pylorus ligated rats **Q. J. Exp. Physiol.**, **53**: 89-92.

Gold W.M, Meyers G.L, Dain D.S, Miller R.L. and Bourne H.R. (1977): Changes in airway mast cells and histamine caused by antigen aerosol in allergic dogs. **J. Appl. Physiol.**, **43**: 271-275.

Guerzon G.M, Paré P.D, Michoud M-C. and Hogg J.C. (1979). The number and distribution of mast cell in monkey lungs. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **119**: 59-65.

Guschin I.S (1976): Electrophysiological characteristics of anaphylaxis of isolated smooth muscle. In Bulbring E. and Shuba M.F. (De.), **Physiology of smooth muscle**. Raven Press, New York, pp419-425.

Gutiérrez-López A. and Alonso-deFlorida F. (1980): Isometric responses in the denervated diaphragmatic muscle of the guinea pig elicited by antigen and histamine. **Acta. physiol. Latinoamer.**, **30**:259-268.

Gutman E (1962): Evidence for the trophic function of the nerve cell in neuromuscular relations. In Gutmann E. and Hnik P. (Eds.), **The effect of use and disuse on neuromuscular functions**. Elsevier Publishing, New York, pp 29-34.

Ham A. W. and Cormack D. H. (1979). **Hystology (8 ed)**. Philadelphia, Lippincott J. B. p 549.

Harris A. J. (1974): Inductive functions of the nervous system. **Ann. Rev. Physiol.**, **36**: 251-305.

Hawkins D.F. and Rosa L.M. (1956): Some discrepancies in the histamine theory of anaphylaxis in smooth muscle. In: Wolstenholme G.E.W. and O'Connor C.M. (Eds.), **Histamine, CIBA Foundation Symposium**. J. & A. Churchill Ltd., London, pp 180-182.

Henson P.M, Henson J.E, Fittschen C, Kimani G, Biatan D.L. and Riches D.W. (1988). **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Raven Press, N.Y. p 363.

Ishizaka K. and Ishizaka T. (1971): IgE and reaginic hypersensitivity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **190**: 443-456.

Ishizaka T. and Ishizaka K. (1984): Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors. **Prog. Allergy.**, **34**:188-235.

Ishizaka K, Ishizaka T. and Hornbrook M. (1966): Physicochemical properties of human reaginic activity. **J. Immunol.**, **97**:75.

Joiner P.D, Wall M, Davis L.B. and Hahn F. (1974): Role of amines in anaphylactic contraction of guinea-pig isolated smooth muscle. **J. Allergy & Clin. Immunol.**, **53**: 261-270.

Jolesz F. and Sreter F. A. (1981): Development, innervation and activity pattern induced changes in skeletal muscle. **Ann. Rev. Physiol.**, **43**:531-552

Kallós P, and Kallós L. (1984): Experimental asthma in guinea pigs revisited. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **73**: 77-85

Kasukawa R, Okada M. and Igari S. (1980): Receptors for IgG₁ Fc and complement in the mammalian aortas. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **61**: 175-182

Kinet J. P. (1989): Antibody-cell interactions: Fc receptors. **Cell**, **57**:351-354.

Lewis D.M. (1972): The effect of denervation on the mechanical and electrical responses of fast and slow mammalian twitch muscle. **J. Physiol.**, **222**: 51-75.

Lichtenstein L.M. (1968): Mechanism of allergic histamine release from human leukocytes. In **Biochemistry of the Acute Allergic Reactions**, Auesten K.F. and Becker E.L. (Ed.), Blackwell Scientific, Oxford, pp 153-174.

Lin R.Y, Racis S.P, Higginbotham-Ford E. and Tanz W.S. (1986): Human splenic Fc receptor function and dysfunction: definition by circulatory clearance role compared to computerized kinetic scintigraphy. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **81**: 35-41.

Metcalf D.D, Kaliner M. and Donlon M. A. (1981): The mast cell. **Crit. Rev. Immunol.**, **Sept**:23-74.

Metzger H. (1976): Early molecular events in antigen-antibody cell activation. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **19**: 427-445.

Meyers F.H, Jaweta E. and Goldfien A. (1980): **Review of Medical Pharmacology** Los Altos Cal. Chap. 19.

Miledi R. and Slater C.R. (1970): On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. **J. Physiol. (Lond.)**, **207**:507-528.

Miller H.R.P (1980): The structure, origin and function of mucosal mast cells. A brief review. **Biol. Cellulaire**, **39**: 229-232.

Mongar J.L, Schild H.O (1962): Cellular mechanisms in anaphylaxis. **Physiol. Rev.**, **42**:226-270.

Muccitelli R.M, Tucker S.S, Hay D.W.P, Torphy T.J, and Wasserman M.A. (1987): Is the guinea pig trachea a good *in vitro* model of human large and central airways? Comparison on leukotriene-, methacholine-, histamine- and antigen-induced contractions. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **243(2)**: 467-473.

Munro M.C. and Linder H.N. (1978): Ferritin: Structure, Biosynthesis, and Role in Iron Metabolism. **Physiol. Rev.**, **58**:317-396.

Nadel J. A (1976): **Bronchial Asthma: Mechanisms and Therapeutics**. Boston. pp 155-162

Nemoto K. and Okamura T (1992): Intracellular signals in IgG-mediated anaphylactic contraction of single smooth muscle cells. **Jpn. J. Allergol.**, **41(2)**:125-134.

Ninomiya J.G, Gijon E. and Alonso de Florida F. (1972): Anaphylactic reaction in the phrenic nerve of the guinea-pig. **Int. J. Neurosci.**, **3**:291-298.

Olmedo M, Berumen E, Blanco L, Cordoba F. and Alondo-deFlorida F. (1965): Respuestas isométricas a la histamin de varios músculos lisos *in vitro*. **Acta. Physiol. Latinoamer.**, **15**:117.

- Padawer J. (1963): Mast cells and basophils. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, **103**:1.
- Paton W.D. (1959): The relation of histamine liberation to anaphylaxis. In **Proc. III Int. Congr. Allergol.**, pp. 433-438.
- Pearce F.L., Behrendt H, Blum U, Poblete-Fruadt G, Pult P. and Stand-Voss C.I. (1977): Isolation and study of functional mast cells from lung and mesentery of the guinea pig. **Agents and Actions**, **7**:45-56.
- Roitt I. (1993): **Essential Immunology**. Blackwells Scientific Publication.
- Sánchez-Mejorada G. and Alonso de Florida F. (1992): Changes in mast-cell distribution in the guinea-pig diaphragm after denervation. **Muscle & Nerve** **15**:716-719.
- Sánchez-Mejorada G, Merchant-Larios H, Morales L.B. and Alonso-deFlorida F. (1994): Probability of mast cells to mediate anaphylaxis in skeletal muscle. **Bull. Math. Biol.**, **56**: 147-160.
- Schwartz L.B. and Austen K.F. (1984): Structure and function to the chemical mediators of mast cells. **Prog. Allergy**, **34**: 271-321.
- Schild H. O. (1956): Histamine release and anaphylaxis. In Wolstenholme G. E. W. and O'Connor C. M. (Eds.), **Histamine, CIBA Foundation Symposium**. J. & A Churchill Ltd., London, pp.139-149.
- Schild H.O. (1979): Recollections and reflections of on autopharmacologist. In Wolstenholme G.E.W. and O'Connor C.M. (Eds.), **Histamine, CIBA Foundation Symposium**. J. & A. Churchill Ltd., London, pp 1-20.
- Schultz W.H. (1910): Physiological studies in anaphylaxis.I The reaction of smooth muscle of the guinea-pig sensitized with horse serum. **J. Pharmacol. exp. Therap.**, **1**:549-567.
- Sethi K.K. and Brandis H. (1980): IgG Fc-binding receptors on spermatozoa. **Eur. J. Immunol.**, **10**: 964-965.
- Skofitsch G, Savitt J. M, Jacobowitz D. M. (1985): Sugestive evidence for a functional unit between mast cells and substance P fibers in the rat diaphragm and mesentery. **Histochemistry**, **81**: 5-8.
- Souhrada J. F. and Dichey D. N. (1976) Effect of antigen challenge on sensitized guinea-pig trachea. **Res. Physiol.**, **27**: 241-257

Souhrada M. and Souhrada J.F. (1984): Immunologically induced alterations of airway smooth muscle cell membrane. **Science**, **225**:723-725.

Souhrada M. and Souhrada J. F. (1993): Effect of IgG₁ and its fragments on resting membrane potential of isolated tracheal myocytes. **J. Appl. Physiol.**, **74**(4):1948-1953

Stanworth D. R (1973): Mechanism of release of mediators of Immediate hypersensitivity. In Tatum E. L. (Ed.), **Immediate hypersensitivity**. American Elsevier, New York, pp 291-328.

Vargas M. H, Montaña L. M, Vanda B, Segura P, and Selman M. (1990): Pharmacological characterization of mediators and vagal influence in the acute allergic bronchoconstriction in guinea pigs. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **342**: 278-283.

Vedeler A. C. (1987): Demonstration of Fc receptors on human peripheral nerve fibers. **J. Neuroimmunol.**, **15**: 2907-2916.

Weinreich D, Udem B. J, Taylor G. and Barry M. F. (1995): Antigen-induced long-term potentiation of nicotinic synaptic transmission in the cervical ganglion of the guinea pig. **J. Neurophysiol.**, **73**(5): 2004-2016.

Williams R M, Bienenstock J. and Stead R. H. (1995): Mast cells: the neuroimmune connection. In Marone G (ed.), **Human Basophils and mast cells: Biological Aspects**. **Chem. Immunol.**, **61**. Basel, Karger, pp 208-235.