



**EFEECTO DE UN NUEVO XANTHANÓLIDO SESQUITERPENO
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE MASTOCITOS
INDUCIDA POR NEUROPEPTIDOS PRO-INFLAMATORIOS**

Vargas P*, Martino E, Fogal T***, Tonn C****, Penissi A*****

*Área e Instituto de Histología y Embriología “Dr. Mario H. Burgos” (IHEM-CONICET) y Área de Anatomía Normal, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

**Área de Anatomía Normal, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Servicio de Neurofisiología, Hospital El Carmen. Mendoza, Argentina.

***Área e Instituto de Histología y Embriología “Dr. Mario H. Burgos” (IHEM-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

****INTEQUI-CONICET-UNSL, Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, San Luis, Argentina.

Autor responsable: Dra. Alicia B. Penissi. Área e Instituto de Histología y Embriología “Dr. Mario H. Burgos” (IHEM-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Casilla de Correo 56. (5500) Mendoza, Argentina. Tel: +54 0261 4135000 interno 2670/2673.

Fax: +54 261 4494117. Correo electrónico: apenissi@fcm.uncu.edu.ar

RESUMEN

Los mastocitos son células del tejido conectivo que participan en la génesis y modulación de las respuestas inflamatorias celulares. En trabajos previos hemos demostrado que xanthatina (xanthanólido sesquiterpeno aislado de *Xanthium cavanillesii* Schouw) inhibe la activación de mastocitos inducida por secretagogos experimentales. Sin embargo, se desconoce su efecto sobre la activación de mastocitos inducida por estímulos fisiopatológicos. Estos estímulos incluyen, entre otros, los neuropéptidos pro-inflamatorios sustancia P y neurotensina, responsables de una de las principales vías de inflamación neurogénica. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de xanthatina sobre la activación de mastocitos inducida por sustancia P y neurotensina. Mastocitos peritoneales de rata se incubaron con: 1) PBS (basal); 2) sustancia P (100 μm); 3) neurotensina (50 μm); 4) xanthatina (8-320 μm)+sustancia P; 5) xanthatina (8-320 μm)+neurotensina. La viabilidad de los mastocitos se evaluó con azul tripán. En las soluciones de incubación se cuantificó serotonina liberada (marcador de activación). En las células se cuantificó serotonina remanente (no liberada) y se analizó la morfología celular por microscopía óptica y electrónica de transmisión. Tratamiento estadístico: ANOVA-1 y Tukey-Kramer. La incubación de mastocitos con xanthatina inhibió ($P < 0,01$), en forma dosis-dependiente, la liberación de serotonina inducida por sustancia P y neurotensina, sin modificar la viabilidad celular. Los mastocitos tratados con neuropéptidos mostraron características morfológicas de degranulación, mientras que la morfología de los mastocitos tratados con xanthatina+neuropéptido fue semejante a los basales. En conclusión, xanthatina inhibe la activación de mastocitos inducida por sustancia P y por neurotensina. Este sesquiterpeno podría representar una nueva alternativa en el tratamiento de las inflamaciones neurogénicas.

ABSTRACT

The present study was designed to examine the effects of a novel natural xanthanolate with anti-ulcer and anti-inflammatory properties (xanthatin) on mast cell activation induced by pro-inflammatory peptides, such as substance P and neurotensin. Peritoneal mast cells from male adult were purified in Percoll, preincubated in the presence of xanthatin and then challenged with the mast cell activators substance P (100 μ m) or neurotensin (50 μ m). Concentration-response studies of mast cell serotonin release evoked by pro-inflammatory neuropeptides, evaluation of mast cell viability and morphology by light and electron microscopy, and drug stability analysis by thin layer chromatography (TLC) were performed. Serotonin release studies, carried out together with morphological studies, showed the effectiveness of xanthatin to stabilize mast cells. The present study provides the first strong evidence in favour of the hypothesis that xanthatin inhibits substance P- and neurotensin-induced serotonin release from peritoneal mast cells, acting thus as a mast cell stabilizer. Our findings may provide an insight into the design of novel pharmacological agents which may be used to regulate the mast cell response in neurogenic inflammation.

Key words: mast cell – xanthatin – substance P – neurotensin

Introducción

Los mastocitos son células especializadas del tejido conectivo que liberan, en respuesta a la activación por estímulos externos, una gran variedad de mediadores biológicamente activos (1-3).

Por el hecho de estar especialmente concentrados en tejidos que se encuentran en contacto con el medio externo (piel, tracto respiratorio, tubo digestivo, vías genitourinarias), son los primeros en detectar un daño tisular, lo que provoca la liberación de mediadores responsables de reclutar a los polimorfonucleares e iniciar las respuestas características de una inflamación aguda (2,4). Los mastocitos pueden inducir de esta manera la activación de células del sistema inmune como granulocitos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK (2).

Los mastocitos juegan un papel central en la patogénesis de enfermedades como el asma, rinoconjuntivitis, urticaria, ciertos tipos de cáncer, anafilaxis, alergias alimentarias, mastocitosis sistémica, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoidea, dermatitis atópica, cistitis intersticial, síndrome del colon irritable, migrañas, esclerosis múltiple e inflamación neurogénica (3,5,6).

Se han identificado dos vías de activación de mastocitos (1,7): 1) Vía inmunológica: es dependiente de la agregación de los receptores Fc ϵ RI y 2) Vía no inmunológica: es independiente de la agregación de los Fc ϵ RI. Entre los secretagogos básicos de vía no inmunológica destacan los neuropéptidos pro-inflamatorios sustancia P y neurotensina. La estimulación de mastocitos inducida por estos neuropéptidos constituye una de las principales vías de inflamación neurogénica (3,8,9).

El proceso de activación mastocitaria culmina con tres respuestas diferentes (10): a) Exocitosis de los gránulos secretorios que contienen moléculas bioactivas

preformadas (degranulación), como la histamina y la serotonina; b) Síntesis “de novo” y secreción de mediadores lipídicos, como las prostaglandinas D₂ (PGD₂) y prostaglandinas E₂ (PGE₂) y c) Síntesis “de novo” y secreción de citoquinas (como IL-1, IL-10 y TNF- α), proceso que se inicia con la activación de NF- κ B.

En trabajos previos hemos demostrado que xanthatina (sesquiterpeno de núcleo xanthanólido α,β -insaturado aislado de *Xanthium cavanillesii* Schouw), previene la formación de lesiones gastrointestinales inducidas por agentes ulcerogénicos y ejerce una potente actividad antiinflamatoria (11-15). Hemos demostrado además que xanthatina inhibe la liberación de histamina y serotonina inducida por secretagogos experimentales como el compuesto 48/80 en mastocitos de roedores (16-19). Sin embargo, se desconoce el efecto de xanthatina sobre la activación de mastocitos inducida por estímulos fisiopatológicos.

El presente trabajo pretende estudiar la acción de xanthatina sobre la activación de mastocitos inducida por neuropéptidos pro-inflamatorios. Este sesquiterpeno podría representar una nueva estrategia farmacológica en el tratamiento de patologías inflamatorias vinculadas con la activación de mastocitos, como la inflamación neurogénica.

Material y métodos

Drogas

Xanthatina fue provista por el Dr. Carlos Tonn (Departamento de Química Orgánica, Instituto de Tecnología Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis). Sustancia P y neurotensina fueron adquiridas en Sigma.

Animales

Se utilizaron ratas machos adultas de la cepa Sprague-Dawley, mantenidas en el bioterio del IHEM bajo estricto control de alimentación, temperatura (22 \pm 1°C) y

períodos de luz/oscuridad (luz de 6:00 a 18:00 y oscuridad de 18:00 a 6:00).

Aislamiento y purificación de mastocitos peritoneales

Los animales se sacrificaron con éter etílico bajo una campana de extracción. Inmediatamente después del sacrificio, los mastocitos fueron aislados por lavado peritoneal y luego purificados en un gradiente discontinuo de solución estéril de Percoll (20). La pureza de las células aisladas se evaluó por tinción con azul de toluidina al 1% en HCl 0,7N. Para los diferentes ensayos se utilizaron las preparaciones con una pureza del 95-100%. La viabilidad de los mastocitos luego de la purificación se analizó por exclusión del colorante azul tripán.

Protocolo general

Los mastocitos peritoneales fueron incubados con: 1) Solución PBS (buffer fosfato salino): grupo basal. Tiempo de incubación: 20 minutos. 2) Sustancia P: se ensayaron diferentes concentraciones de sustancia P (1 μM , 50 μM y 100 μM) para establecer la dosis óptima de activación en nuestro sistema experimental. Tiempo de incubación: 10 min con solución PBS y 10 minutos adicionales con sustancia P. 3) Neurotensina: se ensayaron diferentes concentraciones de neurotensina (1 μM , 50 μM y 100 μM) para establecer la dosis óptima de activación en nuestro sistema experimental. Tiempo de incubación: 10 min con solución PBS y 10 minutos adicionales con neurotensina. 4) Xanthatina+sustancia P (100 μM): se utilizaron diferentes dosis de xanthatina (8 μM , 16 μM , 40 μM , 80 μM , 160 μM y 320 μM) para construir curvas dosis-respuesta. Tiempo de incubación: 10 min con xanthatina y 10 minutos adicionales con sustancia P. 5) Xanthatina+neurotensina (50 μM): se utilizaron diferentes dosis de xanthatina (8 μM , 16 μM , 40 μM , 80 μM , 160 μM y 320 μM) para construir curvas dosis-respuesta. Tiempo de incubación: 10 min con xanthatina y 10 minutos adicionales con neurotensina.

La viabilidad de los mastocitos luego de las incubaciones se analizó por exclusión del colorante azul tripán. En las soluciones de incubación se cuantificó serotonina como marcador de degranulación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección electroquímica. En las células se estudió la concentración de serotonina remanente (no liberada) luego de las incubaciones, la morfología de los mastocitos por microscopía óptica con azul de toluidina y microscopía electrónica de transmisión. La pureza y estabilidad de xanthatina antes y después de las incubaciones fue evaluada por cromatografía en capa fina (TLC).

Cuantificación de serotonina

Los niveles de serotonina, tanto en las soluciones de incubación como en las células remanentes, fueron medidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica de acuerdo con el método de Wagner y cols. (21) con algunas modificaciones (12). Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de serotonina.

Microscopía óptica con azul de toluidina

Las muestras fueron fijadas en una solución de glutaraldehído 5% y formaldehído 4% en buffer cacodilato 0,1 M (pH=7,2). Después de 1 h en el fijador, las células fueron resuspendidas y alícuotas de las resuspensiones fueron colocadas sobre portaobjetos, coloreadas con azul de toluidina al 1% en HCl 0.7N, observadas y fotografiadas bajo un microscopio óptico Nikon Optiphot acoplado a una cámara Nikon CCD color.

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras fueron fijadas en solución de glutaraldehído al 2.5% en PBS (pH=7,4). Después de 1 h en el fijador, las células fueron refijadas en OsO₄ al 1% en buffer cacodilato 0.2M en oscuridad durante 12 h. El material fue deshidratado e incluido en Spurr (Pelco, USA). Se cortaron secciones ultrafinas (60 nm) con ultramicrotomo

(Leica Ultracut R, Austria), se las coloreó con acetato de uranilo y plomo, se las montó sobre grillas (Pelco, USA), se las examinó en un microscopio electrónico de transmisión (Siemens Elmiskop I, Alemania) y se tomaron micrografías.

Cromatografía en capa fina (TLC)

Las soluciones de incubación fueron estudiadas por TLC, antes y después de las incubaciones, para analizar la estabilidad química de la xanthatina. Extractos etílicos de las soluciones de incubación y los standards de xanthatina fueron sembrados en placas para TLC. La cromatografía se desarrolló con acetato de etilo/n-hexano y se reveló con permanganato de potasio. Se calcularon las relaciones de frente (Rf) de las bandas obtenidas.

Tratamiento estadístico

Las diferencias entre los grupos fueron determinadas utilizando análisis de la varianza de tipo 1 (ANOVA-1) seguido por la prueba de Tukey-Kramer. $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Estudios bioquímicos

La incubación de mastocitos con sustancia P (dosis de 1 μM , 50 μM y 100 μM) indujo un incremento significativo ($P < 0,01$) de la liberación de serotonina con respecto al grupo basal (Figura 1A). Ninguno de los grupos experimentales mostró cambios en la viabilidad celular (Figura 1B). Teniendo en cuenta estos resultados se eligió la dosis de sustancia P 100 μM para realizar los ensayos con xanthatina.

La incubación de mastocitos con neurotensina 1 μM no modificó la liberación de serotonina. La incubación de mastocitos con neurotensina 50 μM y 100 μM indujo un incremento significativo ($P < 0,01$) de la liberación de serotonina con respecto al grupo basal. La liberación inducida por neurotensina 50 μM fue similar a observada frente a

la acción de neurotensina 100 μM (Figura 2A). Ninguno de los grupos experimentales mostró cambios en la viabilidad celular (Figura 2B). Teniendo en cuenta estos resultados se eligió la dosis de neurotensina 50 μM para realizar los ensayos con xanthatina.

La incubación de mastocitos con xanthatina (dosis de 8 μM , 16 μM , 40 μM y 80) inhibió ($P < 0,01$), en forma dosis-dependiente, la liberación de serotonina inducida por sustancia P 100 μM (Figura 3A), sin modificar la viabilidad celular (Figura 3B). La incubación de las células con xanthatina 160 μM y 320 μM aumentó la liberación de serotonina con respecto a la dosis de 80 μM (Figura 3A) y disminuyó significativamente ($P < 0,01$) la vitalidad celular (Figura 3B). En base a estos resultados, se seleccionó la dosis de xanthatina de 16 μM para llevar a cabo los estudios morfológicos.

La incubación de mastocitos con xanthatina (dosis de 8 μM , 16 μM , 40 μM y 80) inhibió ($P < 0,01$), en forma dosis-dependiente, la liberación de serotonina inducida por neurotensina 50 μM (Figura 4A), sin modificar la viabilidad celular (Figura 4B). La incubación de las células con xanthatina 160 μM y 320 μM aumentó la liberación de serotonina con respecto a la dosis de 80 μM (Figura 4A) y disminuyó significativamente ($P < 0,01$) la vitalidad celular (Figura 4B). En base a estos resultados, se seleccionó la dosis de xanthatina de 16 μM para llevar a cabo los estudios morfológicos.

Estudios morfológicos

Microscopía óptica

Los mastocitos se identificaron por la presencia en el citoplasma de gránulos secretorios metacromáticos. Los mastocitos del grupo basal presentaron alta densidad granular (Figura 5A). Los mastocitos estimulados con sustancia P 100 μM

(Figura 5B) y con neurotensina 50 μ M (Figura 5C) mostraron un evidente proceso de degranulación. Los mastocitos pretratados con xanthatina 16 μ M y luego estimulados con sustancia P 100 μ M (Figura 5D) o con neurotensina 50 μ M (Figura 5E) presentaron morfología similar a la del grupo basal.

Microscopía electrónica de transmisión

Los mastocitos basales mostraron microvellosidades en la superficie celular y numerosos gránulos de secreción, electrónicamente densos, regularmente distribuidos en todo el citoplasma (Figura 6A). Los mastocitos estimulados con sustancia P 100 μ M (Figura 6B) y con neurotensina 50 μ M (Figura 6C) mostraron gránulos secretorios irregulares con diferentes grados de densidad electrónica y canales de exocitosis. Los mastocitos pretratados con xanthatina 16 μ M y luego estimulados con sustancia P 100 μ M (Figura 6D) o con neurotensina 50 μ M (Figura 6E) mostraron mínima degranulación y características morfológicas similares al grupo basal.

Estudios de estabilidad química de xanthatina

El valor de Rf para xanthatina fue de 0,46. No se observaron cambios de Rf ni bandas de degradación de xanthatina luego de las incubaciones.

Discusión

Los primeros experimentos del presente trabajo fueron diseñados para evaluar el efecto de xanthatina sobre la respuesta secretoria inducida por sustancia P y neurotensina en mastocitos peritoneales. Esta respuesta secretoria fue medida a través de la liberación de serotonina, mediador preformado asociado a la matriz de los gránulos citoplasmáticos. La serotonina es utilizada como un marcador bioquímico de activación de mastocitos, de acuerdo con los trabajos de Taylor y cols. (22), Kim y cols. (23) y Kawamoto y cols. (24).

La sustancia P y la neurotensina son secretagogos de mastocitos capaces de estimular la liberación de serotonina y otros mediadores de la inflamación a partir de los gránulos intracitoplasmáticos (25,26). La sustancia P ejerce su acción por activación de receptores NK1 acoplados a proteínas G heterotriméricas. La estimulación de estos receptores conduce a la activación de fosfolipasa C, con la consiguiente producción de inositol trifosfato y diacilglicerol, que conducen al aumento intracelular de calcio (27). La neurotensina estimula receptores específicos NTR, acoplados también a proteínas G heterotriméricas (28).

Los primeros resultados de nuestro estudio demostraron que la incubación de mastocitos peritoneales con soluciones de sustancia P 100 μ M y neurotensina 50 μ M incrementa la liberación de serotonina con respecto al grupo basal y que este efecto es inhibido por xanthatina en forma dosis-dependiente. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos con azul tripán demostraron que xantahtina no resultó citotóxica, excepto a concentraciones mayores de 160 μ M.

A pesar de las fuertes evidencias bioquímicas, consideramos que se necesitaba además una evaluación morfológica para reforzar la validez de nuestros hallazgos iniciales. Así, diseñamos un segundo conjunto de experimentos para analizar el efecto de la xanthatina sobre la morfología mastocitaria, a nivel de microscopía óptica y electrónica.

Nuestros hallazgos morfológicos, a nivel de la microscopía óptica, demostraron que la xanthatina inhibió la liberación de gránulos metacromáticos mastocitarios, sugiriendo una interacción del sesquiterpeno con la población de mastocitos y una inhibición de la degranulación inducida por la sustancia P y la neurotensina.

Además, en nuestro estudio, la liberación significativamente aumentada de serotonina después del tratamiento con sustancia P y con neurotensina, se relacionó estrechamente con evidentes cambios ultraestructurales mastocitarios. A pesar de

que xanthatina indujo algunos cambios a este nivel, su acción fue significativamente menos dramática que la ejercida por los secretagogos “per se”. Algunos autores han demostrado que, a nivel de la microscopía electrónica de transmisión, los gránulos de los mastocitos basales son homogéneamente densos (29-31). Se ha descrito, además, que la liberación de mediadores mastocitarios está asociada con alteraciones fácilmente detectables en la apariencia ultraestructural de los gránulos, que incluyen un agrandamiento del espacio entre el gránulo y su membrana, edematización granular, disminución de la densidad electrónica del contenido granular y presencia de canales de exocitosis.

El hecho que los mastocitos tratados con xanthatina antes de la sustancia P o de la neurotensina no mostraran evidencias de degranulación podría indicar: 1) cambios en la capacidad de los mastocitos para responder completamente a los secretagogos o: 2) inactivación del secretagogo por interacción química con el sesquiterpeno. Esta segunda posibilidad implicaría cambios estructurales en xanthatina que podrían ser detectadas por cromatografía en capa fina. Así, una evaluación de los valores de Rf para xanthatina fue llevada a cabo. Nuestros resultados demostraron que no hubo cambios en los valores de Rf después de las incubaciones con xanthatina más los secretagogos. En consecuencia, los resultados obtenidos a partir de los estudios por cromatografía en capa fina nos permitieron proponer que no existe unión entre el sesquiterpeno y los secretagogos.

A pesar de que no es posible establecer una correlación estricta entre estudios “in vitro” e “in vivo”, el hecho de que xanthatina inhiba la liberación de serotonina a partir de mastocitos peritoneales, plantea la posibilidad de que el sesquiterpeno podría actuar como un estabilizador mastocitario en el animal intacto.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que xanthatina inhibe la degranulación de mastocitos inducida por sustancia P y por

neurotensina. Estudios adicionales acerca de los mecanismos de los mecanismos de acción del sesquiterpeno permitirán un mejor conocimiento de los cambios celulares y moleculares que tienen lugar en los mastocitos después del tratamiento con xanthatina. Los presentes hallazgos fortalecen la posibilidad de que este sesquiterpeno de origen natural pueda representar una nueva alternativa en el diseño de agentes farmacológicos y en el tratamiento de patologías vinculadas con la activación de mastocitos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP-CONICET 5128) y por la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo (06/J268).

La Srta. Patricia Vargas ha desarrollado sus tareas con una Beca de Investigación para Estudiantes de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo (período 2008-2009, Res. N° 10/08-CD).

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Referencias bibliográficas

1. Kalesnikoff J, Galli SJ: New developments in mast cell biology. *Nature Immunology* 9:1215-1223, 2008.
2. Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M: Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature* 8:478-486, 2008.
3. Rao KN, Brown MA: Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1143:83-104, 2008.
4. Kubes P, Granger DN: Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc Res* 32:699-708, 1996.
5. Gurish MF, Austen KF: The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* 194:F1-F5, 2001.
6. Schmelz M, Petersen LJ: Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci* 16:33-37, 2001.
7. Blank U, Rivera J: The ins and outs of IgE-dependent mast cell exocytosis. *Trends Immunol* 25:266-273, 2004.
8. Richardson JD, Vasko MR: Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J*
9. Moriyama M, Sato T, Inoue H, Fukuyama S, Teranishi H, Kangawa K, Kano T, Yoshimura A, Kojima M: The neuropeptide neuromedin U promotes inflammation by direct activation of mast cells. *J Exp Med* 202:217-24, 2005.
10. Kushnir-Sukhov NM, Brown JM, Wu Y, Kirshenbaum A, Metcalfe DD: Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *J Allergy Clin Immunol* 119:498-499, 2007.
11. Giordano OS, Guerreiro E, Pestchanker MJ: The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J Nat Prod* 53:803-809, 1990.

12. Penissi AB, Fogal T, Guzmán JA, Piezzi RS: Gastroduodenal mucosal protection induced by dehydroleucodine. Mucus secretion and role of monoamines. *Dig Dis Sci* 43:791-798, 1998.
13. Penissi AB, Piezzi RS: Effect of dehydroleucodine on mucus production. A quantitative study. *Dig Dis Sci* 44:708-712, 1999.
14. Penissi AB, Mariani ML, Souto M, Guzmán JA, Piezzi RS: Changes on gastroduodenal 5-hydroxytryptamine-containing cells induced by dehydroleucodine. *Cells, Tissues and Organs* 166:259-266, 2000.
15. Penissi AB, Giordano OS, Guzmán JA, Rudolph MI, Piezzi RS: Chemical and pharmacological properties of dehydroleucodine, a lactone isolated from *Artemisia douglasiana* Besser. *Molecular Medicinal Chemistry* 10:1-11, 2006.
16. Penissi AB, Rudolph MI, Piezzi RS: Gastrointestinal mucosal protection induced by dehydroleucodine: role of mast cells (review). *Biocell* 27:163-172, 2003.
17. Penissi A, Rudolph I, Fogal T, Piezzi R: Changes in duodenal mast cells in response to dehydroleucodine. *Cells Tissues Organs* 173:234-241, 2003.
18. Penissi AB, Rudolph MI, Villar M, Coll RC, Fogal TH, Piezzi RS: Effect of dehydroleucodine on histamine and serotonin release from mast cells in the isolated mouse jejunum. *Inflamm Res* 52:199-205, 2003.
19. Penissi AB, Vera ME, Mariani ML, Rudolph MI, Ceñal JP, de Rosas JC, Fogal TH, Tonn CE, Favier LS, Giordano OS, Piezzi RS: Novel anti-ulcer alpha,beta-unsaturated lactones inhibit compound 48/80-induced mast cell degranulation. *Eur J Pharmacol* 612:122-130, 2009.
20. Calderón GM, Torres-López J, Lin T, Chavez B, Hernández M, Muñoz O, Befus AD, Enciso JA: Effects of toxin A from *Clostridium difficile* on mast cell activation and survival. *Infect Immun* 66:2755-2761, 1998.

21. Wagner J, Vitali P, Palfreyman MG, Zraika M and Huot S: Simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine, 5-hydroxytryptophan, dopamine, 4-hydroxy-3-methoxyphenylalanine, norepinephrine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, 5-hydroxytryptamine, and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat cerebrospinal fluid and brain by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Neurochem* 38:1241-1254, 1982.
22. Taylor AM, Galli SJ, Coleman JW: Stem-cell factor, the kit ligand, induces direct degranulation of rat peritoneal mast cells in vitro and in vivo: dependence of the in vitro effect on period of culture and comparisons of stem-cell factor with other mast cell-activating agents. *Immunology* 86: 427-433, 1995.
23. Kim TD, Eddlestone GT, Mahmoud SF, Kuchtey J, Fewtrell C: Correlating Ca²⁺ responses and secretion in individual RBL-2H3 mucosal mast cells. *J Biol Chem* 272:31225-31229, 1997.
24. Kawamoto K, Aoki J, Tanaka A, Itakura A, Hosono H, Arai H, Kiso Y, Matsuda H: Nerve growth factor activates mast cells through the collaborative interaction with lysophosphatidylserine expressed on the membrane surface of activated platelets. *J Immunol* 168:6412-6419, 2002.
25. Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC, Schleimer RP: Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* 123:398-410, 2008.
26. Katsanos GS, Anogianaki A, Castellani ML, Ciampoli C, De Amicis D, Orso C, Pollice R, Vecchiet J, Tetè S, Salini V, Caraffa A, Patruno A, Shaik YB, Kempuraj D, Doyle R, Antinolfi PL, Cerulli G, Conti CM, Fulcheri M, Neri G, Sabatino G: Biology of neurotensin: revisited study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21:255-259, 2008.

27. Schäffer M, Beiter T, Becker HD, Hunt TK: Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? Arch Surg. 133:1107-1116, 1998.
28. Castagliuolo I, Wang CC, Valenick L, Pasha A, Nikulasson S, Carraway RE, Pothoulakis C: Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. J Clin Invest 103:843-849, 1999.
29. Lawson D, Raff MC, Gomperts B, Fewtrell C, Gilula NB: Molecular events during membrane fusion. A study of exocytosis in rat peritoneal mast cells. J Cell Biol 72:242-259, 1977.
30. Dvorak AM: Ultrastructural studies of human basophils and mast cells. J Histochem Cytochem 53:1043-1070, 2005.
31. Pickett JA, Edwardson JM: Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. Traffic 7:109-116, 2006.

SUSTANCIA P

Estudio dosis-respuesta

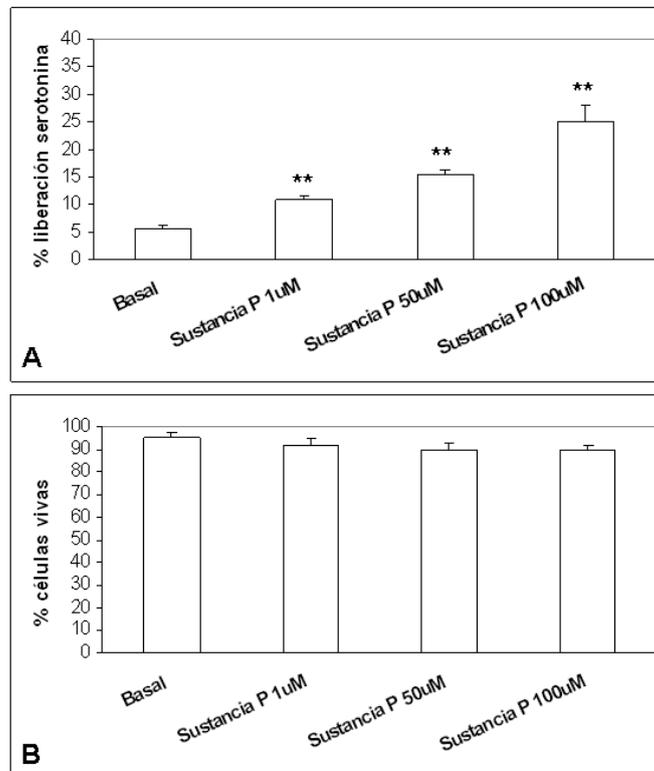


Figura 1. A: Efecto de concentraciones crecientes de sustancia P sobre la liberación de serotonina mastocitaria. Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de serotonina. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. ** $P < 0,01$ versus basal. **B:** Efecto de concentraciones crecientes de sustancia P sobre la vitalidad mastocitaria. Los resultados se expresaron como porcentaje de células vivas. Los valores se presentan como media \pm S.E.M.

NEUROTENSINA Estudio dosis-respuesta

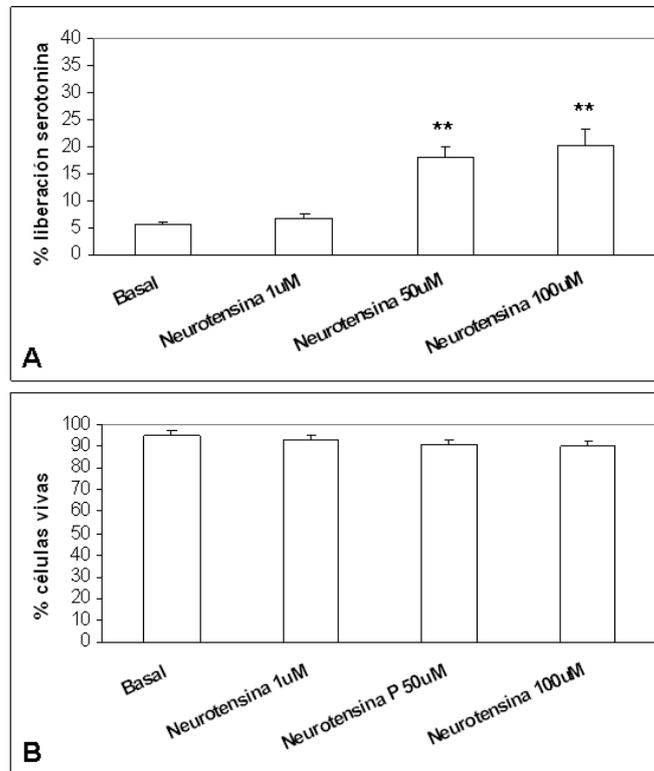


Figura 2. A: Efecto de concentraciones crecientes de neurotensina sobre la liberación de serotonina mastocitaria. Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de serotonina. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. ** $P < 0,01$ versus basal. **B:** Efecto de concentraciones crecientes de neurotensina sobre la vitalidad mastocitaria. Los resultados se expresaron como porcentaje de células vivas. Los valores se presentan como media \pm S.E.M.

XANTHATINA+SUSTANCIA P Estudio dosis-respuesta

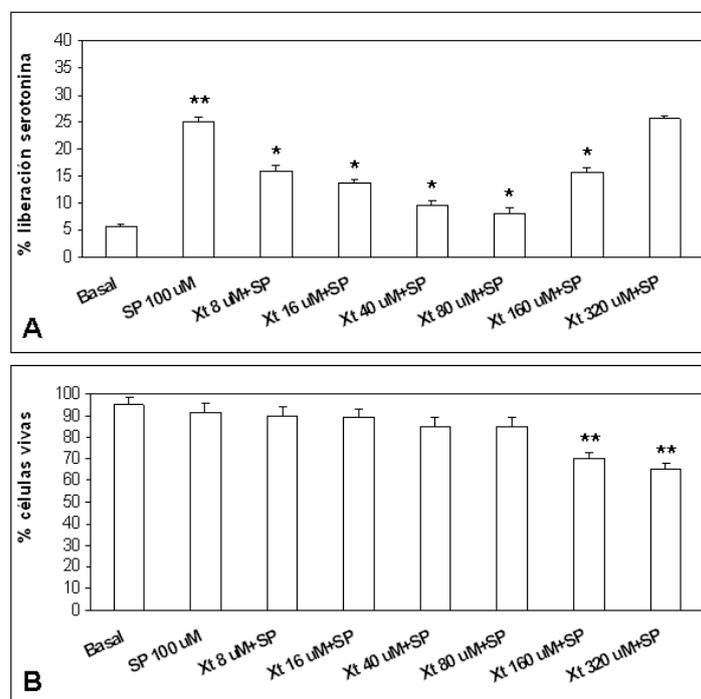


Figura 3. A: Efecto de concentraciones crecientes de xanthatina (Xt) sobre la liberación de serotonina mastocitaria inducida por sustancia P 100 μM (SP). Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de serotonina. Los valores se presentan como media ± S.E.M. **P<0,01 versus basal y *P<0,01 versus sustancia P. **B:** Efecto de concentraciones crecientes de xanthatina (Xt) más sustancia P 100 μM (SP) sobre la vitalidad mastocitaria. Los resultados se expresaron como porcentaje de células vivas. Los valores se presentan como media ± S.E.M. **P<0,01 versus basal.

XANTHATINA+NEUROTENSINA Estudio dosis-respuesta

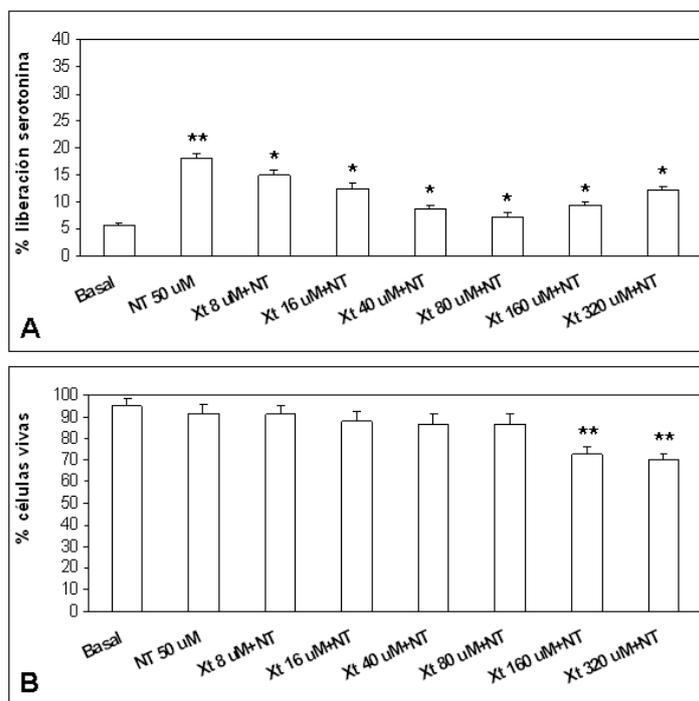


Figura 4. A: Efecto de concentraciones crecientes de xanthatina (Xt) sobre la liberación de serotonina mastocitaria inducida por neurotensina 50 μ M (NT). Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de serotonina. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. ** $P < 0,01$ versus basal y * $P < 0,01$ versus sustancia P. **B:** Efecto de concentraciones crecientes de xanthatina (Xt) más neurotensina 50 μ M (NT) sobre la vitalidad mastocitaria. Los resultados se expresaron como porcentaje de células vivas. Los valores se presentan como media \pm S.E.M. ** $P < 0,01$ versus basal.

MICROSCOPIA ÓPTICA
Azul de toluidina

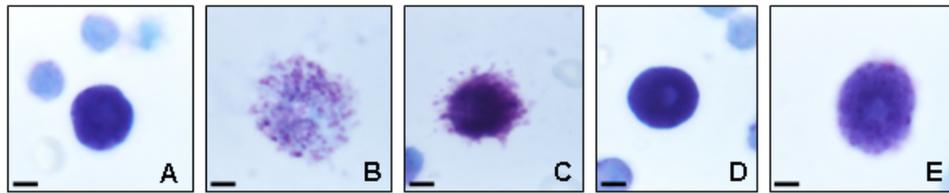


Figura 5. Microscopía óptica de mastocitos peritoneales de rata coloreados con azul de toluidina. **A:** Basal. **B:** Sustancia P 100 μ M. **C:** Neurotensina 50 μ M. **D:** Xanthatina 16 μ M + Sustancia P 100 μ M. **E:** Xanthatina 16 μ M + Neurotensina 50 μ M. Barra = 10 μ m

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

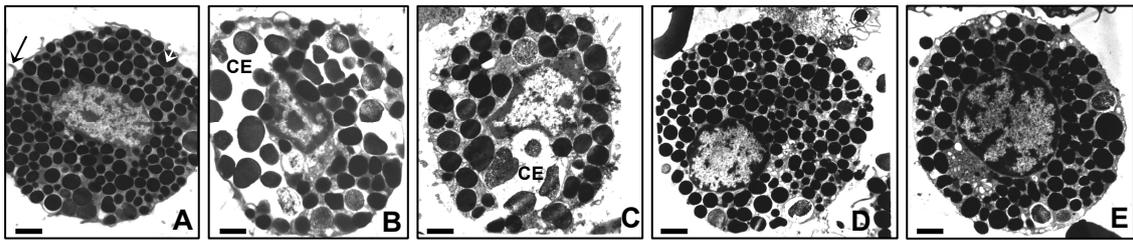


Figura 6. **A:** Microscopía óptica de mastocitos peritoneales de rata coloreados con azul de toluidina. **A:** Basal. **B:** Sustancia P 100 μ M. **C:** Neurotensina 50 μ M. **D:** Xanthoxina 16 μ M + Sustancia P 100 μ M. **E:** Xanthoxina 16 μ M + Neurotensina 50 μ M. Barra = 3 μ m. Flecha negra: microvellosidad. Flecha blanca: gránulo citoplasmático homogéneamente denso. CE: canal de exocitosis.