



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SEDE SUR**

Departamento de Farmacobiología

**Papel de los canales de calcio tipo L en la activación de
células cebadas a través del receptor FcεRI**

Tesis que presenta

Jesús Daniel Zambrano Romero

Para obtener el grado de

Maestro en ciencias en

Neurofarmacología y terapéutica experimental

Directores de tesis

Dra. Claudia González Espinosa

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

AGRADECIMIENTO AL CONACYT

Este trabajo se realizó en los laboratorios N°9 y N°11 del departamento de Farmacobiología del Cinvestav, Unidad Sede Sur. Durante el desarrollo de esta tesis, se contó con el apoyo del proyecto CB-2016-281617 para EJGE y la beca N° 931997 de Conacyt para JDZR.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Claudia González Espinosa y al Dr. Emilio J. Galván Espinosa por recibirme en sus laboratorios y enseñarme más del conocimiento necesario para poder desarrollar este proyecto. Les agradezco sus consejos y confianza de haber creído en mí, tanto en el aspecto profesional como académico durante la realización de mi trabajo de maestría.

A los Doctores: Mónica Lamas Gregori y Juan Carlos Gómora Martínez por sus consejos y valiosas aportaciones que enriquecieron esta tesis.

Al M. en C. y gran amigo Alfredo Ibarra Sánchez por haberme enseñado todo sobre las técnicas que realicé durante mi proyecto de maestría. Además, de todo su apoyo incondicional durante mi estancia en el laboratorio 11.

Al técnico y gran amigo Juan J. López Guerrero por haberme dado todo su apoyo en los problemas técnicos que enfrente durante mi proyecto. También, le agradezco por todos los momentos divertidos que pasamos juntos durante mi estancia en el laboratorio 9.

A mis amigos y compañeros de los laboratorios 9 y 11: Magnolia, Rodolfo, Deisy, Ernesto, Gabriel, Johaly, Guadalupe, Frida, Zyanya, Dulce, Estefanía, Itzel, Jezabel, Jorge, Pablo y Jaqueline por su apoyo y los momentos tan gratos que tuvimos juntos durante todo el tiempo de mi estancia en el Cinvestav.

Al señor Ramón del bioterio Cinvestav Sede Sur por su apoyo para el mantenimiento de las colonias de ratones utilizadas para la realización de esta tesis.

A mi familia, novia y amigos externos al Cinvestav, por ser siempre una parte fundamental de mi vida profesional y personal. Por obtener de todos ellos su apoyo moral e incondicional y por haberme acompañado en todos mis enojos, frustraciones, preocupaciones y alegrías que tuve durante mi transcurso en la maestría

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.	10
1.1.	LAS CÉLULAS CEBADAS (MC). GENERALIDADES SOBRE SU ORIGEN, LOCALIZACIÓN Y FUNCIONES.	10
1.2.	LA IMPORTANCIA DE LAS MC EN LAS REACCIONES ALÉRGICAS.	12
1.3.	EL RECEPTOR FcεRI: ESTRUCTURA, FUNCIONES Y MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN MC.	14
1.3.1.	Desgranulación inducida por el FcεRI en MC: la desgranulación anafiláctica.	17
1.4.	EL CALCIO COMO UN SEGUNDO MENSAJERO EN LAS MC.	18
1.4.1.	El calcio es un catión vital para la función celular.	18
1.4.2.	Canales de Ca ²⁺ expresados en células excitables y no excitables.	19
1.4.3.	La corriente SOCE como la principal entrada de Ca ²⁺ en MC.	19
1.4.4.	Canales de calcio dependientes de voltaje: estructura y clasificación.	21
1.4.5.	Los canales de Ca ²⁺ tipo L como nuevos e importantes participantes en la función de MC.	22
2.	GENERALIDADES DEL PROYECTO.	24
2.1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.	24
2.2.	HIPÓTESIS.	25
2.3.	OBJETIVOS.	25
2.3.1.	<i>Objetivo general</i>	25
2.3.2.	<i>Objetivos particulares.</i>	25
3.	DISEÑO EXPERIMENTAL.	25
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.	28
4.1.	ANIMALES.	28
4.2.	CULTIVO DE BMMCs.	29
4.4.	REACTIVOS.	30
4.5.	REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.	30
4.6.	EXTRACCIÓN DE ARNM Y RT-PCR.	31
5.	RESULTADOS.	32
5.1.	ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PATCH CLAMP EN EL REGISTRO DE BMMCs.	32
5.2.	LA ESTIMULACIÓN DE BAJA Y ALTA INTENSIDAD CON ANTÍGENO INDUCE UN AUMENTO EN LA AMPLITUD DE LAS CORRIENTES DE CALCIO EN BMMCs.	34

5.4.	LA CINASA LYN ES IMPORTANTE PARA LA INDUCCIÓN DE LA CORRIENTE DE Ca^{2+} EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN ANTIGÉNICA DE BAJA Y ALTA INTENSIDAD EN BMMCs.	42
5.5.	LA ENTRADA DE Ca^{2+} A TRAVÉS DE CCTL ES NECESARIO PARA LA ACUMULACIÓN DEL ARNM DE CITOCINAS EN BMMCs.	45
6.	DISCUSIÓN.	47
7.	CONCLUSIONES.	52
8.	PERSPECTIVAS.....	53
9.	BIBLIOGRAFIA.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
ARE	Elementos ricos en adenina y uracilo
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AUF	Proteína de unión a ARN de elemento rico en adenina-uracilo
BMCP	Progenitor bipotencial de basófilos/células cebadas
BMMCs	Células cebadas derivadas de la médula ósea
Ca ²⁺	Calcio
Ca _v	Canales de calcio dependientes de voltaje
CCL	Ligando de quimiocinas
CCTL	Canal de calcio de tipo L
Cm	Capacitancia membranal
CMP	Precursor mieloide común
CRAC	Canales de calcio activados por la liberación de calcio
DAG	Diacilglicerol
DHPs	Dihidropiridinas
DNP-HSA	Dinitrofenol acoplado a albúmina sérica humana
FcεRI	Receptor de alta afinidad por la inmunoglobulina E
Fyn	Tirosina cinasa proto-oncogen
GAB2	Proteína de unión 2 asociada a Grb2
GMP	Progenitor de granulocitos/monocitos
GS	Gránulo secretor especializado
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
HSC	Células troncales hematopoyéticas
HuR	Antígeno R humano
IgE	Inmunoglobulina E

IL	Interleucina
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₃ R	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
ITAM	Dominio de activación de inmunoreceptores basado en tirosinas
LAD-2	Línea de células cebadas humanas
LAT	Conector de activación de células T
Lyn	Nueva tirosina cinasa Lck/Yes
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MC	Células cebadas
MC/MP	Progenitor comprometido de células cebadas/monocitos
MC _M	Células cebadas de tipo mucosal
MCp	Precusores de células cebadas
MCP-1	Proteína 1 quimioatrayente de monocitos
MC _Q	Células cebadas que contienen predominantemente químasa
MC _T	Células cebadas que contienen predominantemente triptasa
MC _{TC}	Células cebadas de tejido conectivo
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MPP	Progenitor multipotencial
NF-κB	Factor nuclear κB
NMDA	N-metil-D-aspartico
PDK1	Proteína cinasa 1 dependiente de la PI3K
PI3K	Fosfatidil inositol 3-cinasa
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PL	Fosfolipasa
PMR	Potencial de membrana en reposo

PP2A	Proteína fosfatasa 2A
RBL-2H3	Línea celular de leucemia de rata similar a las células cebadas
RBPs	Proteínas de unión a regiones no codificantes del ARNm
RE	Retículo endoplásmico
ROCs	Canales de calcio operados por receptores
RTKs	Receptores con actividad de cinasa de tirosina
S1P	Esfingosina 1-fosfato
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
SH2	Dominios de homología SRC2
SMOCs	Canales de calcio operados por segundos mensajeros
SOCE	Entrada de calcio operada por almacenes intracelulares
SPHKs	Cinasas de esfingosina
Src	Sarcoma
STIM	Molécula de interacción estromal
Syk	Tirosina cinasa del bazo
TCR	Receptor de células T
Tg	Tapsigargina
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
T _H	Linfocitos T cooperadores
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
T _{reg}	Linfocitos T reguladores
TTP	Tristetraprolina
UP	Progenitor no comprometido de células cebadas
WT	Cepa de tipo silvestre

RESUMEN

Las células cebadas (MC, por sus siglas en inglés) son células del sistema inmune innato que están íntimamente relacionadas con el desarrollo de las reacciones alérgicas. En respuesta a alérgenos, las MC liberan una gran cantidad de citocinas y otros mediadores químicos. Tales antígenos (Ag) son reconocidos por las MC a través de la IgE unida a receptores FcεRI expresados en su superficie celular. La función de la entrada de calcio dependiente de la depleción de calcio de pozos intracelulares (SOCE) mediada por la apertura de canales CRAC en respuesta a la activación del receptor FcεRI ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas. No obstante, otros mecanismos diferentes a la SOCE que han sido reportados en MC se han estudiado poco. El reciente hallazgo de la expresión de canales de calcio de tipo L (CCTL) en células cebadas ha generado un interés en estudiar la función de estos canales de calcio en las respuestas celulares relacionadas a la activación del receptor FcεRI. Realizando registros electrofisiológicos en células cebadas derivadas de la médula ósea de ratón (BMMCs), en este trabajo demostramos que la estimulación del receptor FcεRI con IgE/Ag promueve una corriente de calcio ($I_{Ca^{2+}}$) a partir de la apertura de CCTL de una manera dependiente de la concentración de antígeno. Esta entrada de Ca^{2+} a través de CCTL fue necesaria para la acumulación del ARNm de la quimiocina CCL2 cuando las BMMCs fueron expuestas a una concentración de 10 ng/ml de antígeno. De manera interesante, el influjo de calcio proveniente de CCTL fue necesaria para frenar la acumulación del ARNm de la IL-3 cuando las BMMCs fueron expuestas a una concentración de 1 ng/ml de antígeno. Estos resultados sugieren un papel de la $I_{Ca^{2+}}$ a través de CCTL en la activación de mecanismos moleculares que regulan la acumulación génica diferencial de citocinas dependiente de la intensidad del estímulo antigénico que ocurre en BMMCs.

Por otro lado, en este trabajo analizamos el papel de las cinasas de tirosinas Lyn y Fyn en la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por complejos IgE/Ag. Utilizando BMMCs carentes en cada una de estas cinasas, demostramos que la activación de la cinasa de tirosina Lyn es requerida para observar la $I_{Ca^{2+}}$ en respuesta a estímulos de baja y alta intensidad con antígeno. Este resultado sugiere la importancia de la cinasa Lyn para generar la apertura de CCTL, con la consecuente entrada de Ca^{2+} a partir de la activación del receptor FcεRI en BMMCs.

ABSTRACT

Mast cells (MC) belong to the innate immune system and are related to the development of allergic reactions. In response to allergens, MC release a large amount of cytokines and other chemical mediators. Such antigens (Ag) are recognized by MC through IgE bound to FcεRI receptors expressed on their cell surface. The role of store-operated calcium entry (SOCE) mediated by the opening of CRAC channels in response to FcεRI receptor activation has been extensively studied. However, mechanisms other than SOCE have been reported in MC, which have been little studied. The recent finding of the expression of L-type calcium channels (CCTL) in mast cells has generated an interest in studying the role of these calcium channels in cellular responses related to FcεRI receptor activation. In this work, by means of patch clamp, whole cell recording performed in mast cells derived from mouse bone marrow (BMMCs), we demonstrated that stimulation of the FcεRI receptor with IgE / Ag promotes a calcium current ($I_{Ca^{2+}}$) from the opening of CCTL in a manner dependent on the antigen concentration. This calcium entry through CCTL is necessary for the accumulation of CCL2 chemokine mRNA when the BMMCs were exposed to a concentration of 10 ng/ml antigen. Calcium influx through CCTL is a necessary step to slow down the accumulation of IL-3 mRNA when the BMMCs are exposed to a concentration of 1 ng/ml of antigen. These results suggest a role of $I_{Ca^{2+}}$ through CCTL for the activation of the molecular mechanisms that regulate the differential gene accumulation of cytokines dependent on the intensity of the antigenic stimulus that occurs in BMMCs.

On the other hand, in this work we analyze the role of Lyn and Fyn tyrosine kinases in $I_{Ca^{2+}}$ induced by IgE/Ag complexes. In BMMCs defective in each of these kinases, we demonstrate that activation of Lyn tyrosine kinase is required to observe the $I_{Ca^{2+}}$ in response to low and high intensity antigenic stimuli. This result suggests the importance of Lyn kinase to generate the opening of CCTL, with the consequent entry of Ca^{2+} from the activation of the FcεRI receptor in BMMCs.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Las células cebadas (MC). Generalidades sobre su origen, localización y funciones.

Las células cebadas (MC, *por sus siglas en inglés*) forman parte del sistema inmune innato. Estas células participan en las respuestas rápidas que caracterizan a la “primera línea de defensa” del sistema inmune. Para llevar a cabo su papel regulador en la respuesta inmune innata, este linaje celular se ha especializado en la secreción de moléculas bioactivas, algunas de las cuales se encuentran almacenadas en gránulos citoplásmicos. La variedad de dichos mediadores es grande, ya que incluye desde moléculas pequeñas solubles como histamina y serotonina, hasta proteínas como proteasas, citocinas, y factores de crecimiento (Figura 1). Adicionalmente, las MC sintetizan derivados del ácido araquidónico (como prostaglandinas y leucotrienos), que ejercen acciones moduladoras en las reacciones inflamatorias.

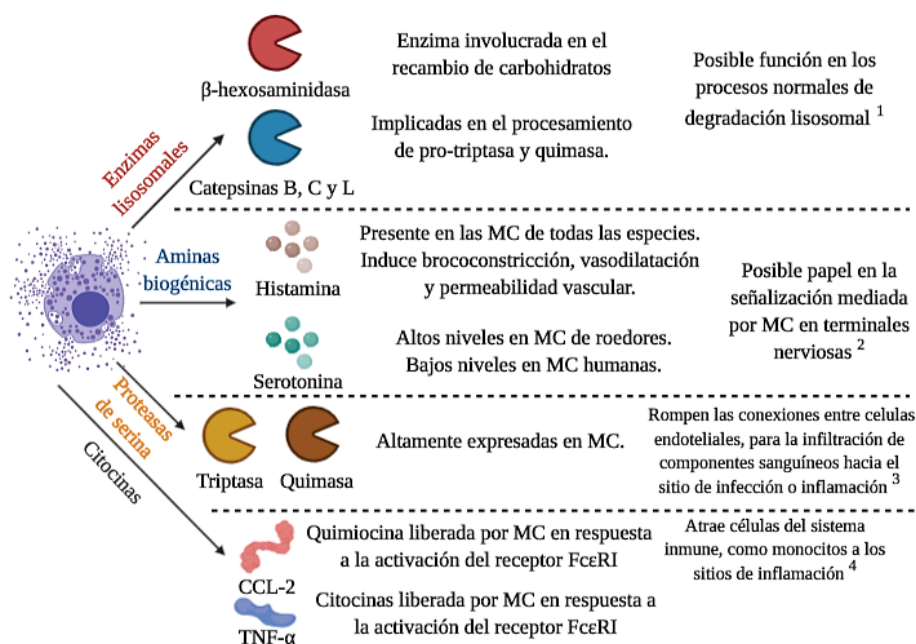


Figura 1. Características y funciones de mediadores almacenados en gránulos de MC. Se muestran algunas moléculas bioactivas liberadas por las MC como resultado de su activación. Fuente: adaptada de Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). ¹(Lawrence B Schwartz, Austen, & Stephen, 1979; L. B. Schwartz & Austen, 1980), ²(Riley, 1953; Sjoerdsma, A., Waalkes, T.P., & Weissbach, 1957; Rowley & Benditt, 1955), ³(Benditt & Arase, 1959; Glenner, George G., Cohen, 1960), ⁴(Gordon & Galli, 1990)(Bradding et al., 1992) (Linsdted et al., 2001).

La activación de las MC se traduce en una liberación rápida de las moléculas bioactivas almacenadas o una secreción más lenta de aquellas sintetizadas de *novo*, las que, a su vez tendrán efectos en células que expresen receptores para ellas. Por esta razón, las funciones fisiológicas de las MC son amplias, ya que participan en diferentes procesos fisiológicos normales,

como la reparación de tejidos y cicatrización, y en el desarrollo de procesos fisiopatológicos. Algunos de los efectos generados por los mediadores secretados de las MC son: el aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, contracción del musculo liso bronquial y visceral, inflamación, entre otros (Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, 2015).

Los efectos de la activación de las MC dependen en gran medida de su localización tisular. Estas células se distribuyen principalmente cerca de los vasos sanguíneos, de terminales nerviosas periféricas y en aquellas estructuras anatómicas donde el organismo tiene contacto directo con el ambiente externo, como la piel (dermis e hipodermis), mucosa pulmonar y gastrointestinal. De igual manera, se ha reportado que las MC están presentes en ciertas zonas del sistema nervioso central (Florenzano & Bentivoglio, 2000; Nautiyal, Liu, Dong, & Silver, 2011). La presencia de MC en diferentes tejidos, así como la expresión de genes específicos dependientes de su localización (Frossi, Mion, Sibilano, Danelli, & Pucillo, 2018), sugieren una marcada multifuncionalidad en este tipo celular.

Durante el desarrollo embrionario, el origen de las MC se encuentra en el saco vitelino (Gautier et al., 2018). Aunque se han descrito algunos otros sitios de origen para las MC murinas y humanas, éstas tienen un origen hematopoyético en la etapa adulta, ya que provienen de un progenitor multipotente (MPP) derivado de células troncales hematopoyéticas (HSC) de la médula ósea. En ratones, un precursor mielóide común (CMP) derivado de un MPP origina un progenitor de granulocitos/monocitos (GMP) (Chen, Grimbaldston, Tsai, Weissman, & Galli, 2005). Además, hay precursores comprometidos de MC (MCp) que provienen directamente de GMP de médula ósea o de progenitores bipotentes para basófilos/MC en el bazo (BMCP) (Arinobu et al., 2005; Oliver et al., 2005). Por otra parte, se ha postulado que las MC humanas se originan de un progenitor no comprometido (UP) aún no identificado que origina un progenitor comprometido de MC/monocitos (MC/MP) en médula ósea y a MCp identificados en sangre. En ambas especies, los MCp migran desde la médula ósea como precursores inmaduros y al viajar a través de la circulación sistémica llegan al tejido donde se requiere su función. Este proceso sucede en aquellos sitios donde ocurre un daño o infección y se requiere de un mayor número de MC (Bankova, Dwyer, Liu, Austen, & Gurish, 2015). Cuando los MCp llegan al tejido blanco, dan lugar a MC maduras, donde su fenotipo va a estar determinado por los factores que se encuentran en el microambiente tisular.

Las MC humanas se han clasificado en función del tipo de proteasas de serina contenidas en sus gránulos. Aquellas que contienen predominantemente triptasa (MC_T) o quimasa (MC_Q) (Irani, Schechter, Craig, DeBlois, & Schwartz, 1986). Las proteasas de serina rompen las uniones entre las células que forman un tejido para permitir la infiltración de células o de componentes en la sangre, como ocurre en el proceso de inflamación. Un ejemplo de esta diferencia fenotípica se

observa en el ratón donde existen dos grandes poblaciones en función del tejido de localización, las MC de tejido conectivo (MC_{TC}) y las MC de mucosa (MC_M), y en función de su contenido de proteasas, las positivas a triptasa y quimasa (MC_{TQ}) o únicamente las positivas a triptasa (MC_T). En consecuencia, las MC presentan diferencias en el contenido granular y en los patrones de expresión de citocinas y receptores que les proporcionan funciones relacionadas con el contexto tisular (Saito et al., 2006).

1.2. La importancia de las MC en las reacciones alérgicas.

El término alergia se utiliza para referirse a un conjunto de padecimientos que tienen un origen en respuestas inmunes hiperreactivas. La razón por la que sucede este fenómeno se debe a que en ocasiones las respuestas inmunitarias pueden controlarse de forma inadecuada, es decir, se dirigen inapropiadamente a los tejidos del anfitrión o las desencadenan microorganismos comensales o antígenos ambientales habitualmente inocuos. Las enfermedades por hipersensibilidad se clasifican con frecuencia en función del tipo de respuesta inmunitaria y de los mecanismos efectores responsables de las lesiones celulares y tisulares. Las reacciones alérgicas, también son conocidas como reacciones de hipersensibilidad de tipo I, se caracterizan por la producción desregulada de anticuerpos IgE específicos para los antígenos por los cuales fueron sintetizados (Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, 2015).

El mecanismo general por el cual suceden las reacciones de hipersensibilidad tipo I comienza cuando células presentadoras de antígeno, lo procesan y lo presentan a linfocitos T cooperadores productores de IL-4, IL-5 e IL-13 (T_H2) (Figura 2). Por lo tanto, la presentación del antígeno es necesaria para comenzar la producción y liberación de IL-4 e IL-13 por parte del linfocito T_H2 . Dichas interleucinas estimulan a linfocitos B para inducir el cambio de clase de anticuerpos hacia la producción del anticuerpo IgE. Las MC se encuentran íntimamente ligadas al desarrollo de trastornos alérgicos, porque expresan receptores de alta afinidad por la IgE localizados en su superficie membranal. El reconocimiento de la IgE por las MC es una señal conocida como sensibilización, lo que las prepara para su activación inmediata frente al encuentro con el alérgeno para el cual fue producida la IgE. La activación inmediata de MC mediada por este mecanismo da lugar a la secreción de mediadores preformados almacenados en gránulos y sintetizados *de novo* de origen lipídico y citocinas que aumentan la permeabilidad vascular, producen vasodilatación y contraen el músculo liso bronquial y visceral (Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, 2015).

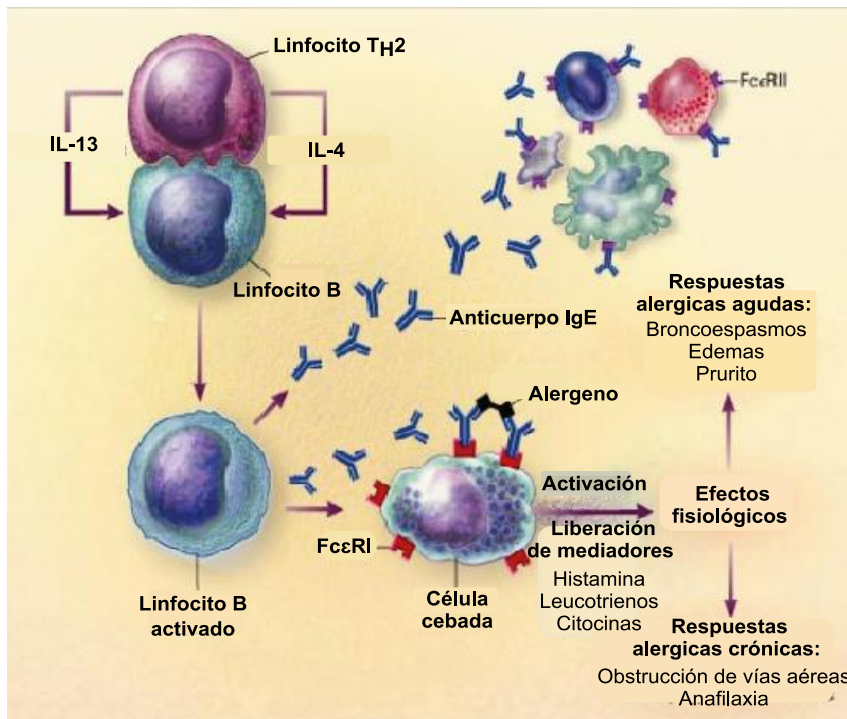


Figura 2. Mecanismo general de las reacciones de hipersensibilidad tipo I. Los linfocitos T_H2 secretan principalmente IL-4 e IL-13 en respuesta a antígenos como alérgenos ambientales para inducir la producción de IgE en linfocitos B. La concentración de IgE aumenta en la circulación sanguínea y se une a receptores de alta afinidad por la IgE (FcεRI) expresados en la membrana plasmática de células cebadas. Tan pronto se presenta el alérgeno es reconocido por la IgE en MC, activándolas e induciendo la liberación de mediadores de bajo peso molecular como histamina, derivados del ácido araquidónico y citocinas, lo que puede desencadenar reacciones alérgicas. Dependiendo del número de agregados compuestos por FcεRI/IgE/Ag que se formen en la superficie de las MC, se liberan distintos tipos de mediadores y se producen reacciones de baja o alta intensidad. Fuente: Adaptada de Pernis, A., & Rothman, P. (2002).

Las citocinas son proteínas no estructurales de bajo peso molecular (entre 8-40 kDa) con efectos variables. Las citocinas inducen proliferación y diferenciación celular, al igual que la regulación de las respuestas inmunológicas. Las citocinas provenientes de células del sistema inmune pueden dividirse en dos grandes grupos en función de su participación en procesos de infección o inflamación. Aquellas que promueven la inflamación se denominan citocinas proinflamatorias y aquellas que suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias se denominan citocinas antiinflamatorias. Por ejemplo, las IL-4, IL-10 e IL-33 son potentes agentes antiinflamatorios, porque pueden suprimir la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y el TNF- α (Dinarello, 2000). Las citocinas proinflamatorias han sido por mucho tiempo el blanco terapéutico para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, un exceso en la liberación de interleucina 1 β (IL-1 β) derivada de MC, participa en la generación de enfermedades autoinflamatorias en la piel (Nakamura et al., 2012), y el bloqueo de las acciones de la IL-1 β se ha utilizado como estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades crónicas, incluida la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis reumatoide y diversas enfermedades autoinmunes

(Striz, 2017). Por otra parte, se sabe que la interleucina 6 (IL-6) está involucrada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, ya que promueve la diferenciación específica de células Th17 desde células T CD4⁺ naive e inhibe la diferenciación de células Treg inducida por TGF- β (Bettelli et al., 2006; Kimura & Kishimoto, 2010). Además, las citocinas tienen funciones pleiotrópicas, es decir, una misma citocina puede desencadenar efectos distintos en función del tipo celular donde esté actuando.

Entre las citocinas se encuentran también, aquellas que inducen el movimiento de las células del sistema inmune y regulan su migración desde la sangre a los tejidos, llamadas quimiocinas. Se han identificado aproximadamente 50 quimiocinas endógenas en humanos y ratones, y sus funciones son importantes para el desarrollo de las células del sistema inmune y para el reclutamiento de estas en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (Collington et al., 2010; Yoshimura, 2018). La quimiocina CCL2 (también conocida como MCP-1) es un potente quimioatrayente, la cual es producida por una gran variedad de tipos celulares, entre ellos las MC.

1.3. El receptor Fc ϵ RI: estructura, funciones y mecanismos de transducción de señales en MC.

Las MC maduras expresan un receptor de alta afinidad por el fragmento Fc específico de las IgEs, denominado Fc ϵ RI. La IgE y el Fc ϵ RI acoplados en la superficie de las MC forman un complejo molecular que reconoce a los antígenos para los cuales esos anticuerpos fueron generados. La afinidad del Fc ϵ RI por la IgE es de las más altas encontradas en sistemas biológicos ($K_D \sim 1 * 10^{-10} M$). El receptor Fc ϵ RI se compone de una cadena α que en su dominio extracelular une al fragmento Fc de una sola molécula de IgE, una cadena β y dos cadenas γ unidas por puente disulfuro (homodímero) (Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, 2015). Otros tipos de células, como células dendríticas y eosinófilos, expresan la estructura trimérica del Fc ϵ RI compuesto por la cadena α y las dos cadenas γ , únicamente (Kinet, 1999).

La interacción de dos complejos de IgE/Fc ϵ RI inducida por la unión de una sola molécula de antígeno multivalente ocasiona un fenómeno llamado entrecruzamiento (Figura 3). Cuando este se lleva a cabo, las cadenas β y γ son las responsables de comenzar los mecanismos de transducción de señales en el interior de la MC (Blank & Rivera, 2004). Se han descrito dos vías de señalización principales iniciadas por cinasas de tirosina de la familia de Src (SFKs) en respuesta al entrecruzamiento de los receptores Fc ϵ RI. Una de esas vías es comenzada por activación de la tirosina cinasa Lyn. Las cadenas β y γ contienen un dominio de activación de inmunoreceptores basado en tirosinas (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM). La tirosina cinasa Lyn se asocia de manera constitutiva a la cola intracelular de la cadena β del Fc ϵ RI. Cuando el antígeno entrecruza a los receptores que tienen IgE unida, Lyn fosforila los dominios

ITAM de las cadenas β y γ (Figura 3). Esto resulta en la asociación de ambas cadenas con moléculas de señalización intracelulares que contienen en su estructura dominios de homología SRC 2 (SH2). La primera proteína reclutada tras este paso es la tirosina cinasa Syk en la ITAM de la cadena γ , que al ser fosforilada se activa. A su vez Syk fosforila otras proteínas de señalización, entre ellas varias enzimas y proteínas adaptadoras. Una de éstas es LAT (linker of activation of T-cells). LAT participa en el ensamblaje y activación de grandes complejos de señalización que incluye a la enzima fosfolipasa $C\gamma$ (PLC γ), entre otras. Una vez activada la PLC γ conduce a la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$). Este último promoverá la movilización y aumento de Ca^{2+} citosólico desde el retículo endoplásmico (RE). Por otro lado, el DAG que se mantiene en la membrana plasmática funciona como señal de unión de proteínas cinasa C (PKCs), activándolas (Kraft & Kinet, 2007). Las PKCs pueden inducir la desgranulación en MC al fosforilar la cadena ligera de miosina del citoesqueleto y promover el movimiento de los gránulos.

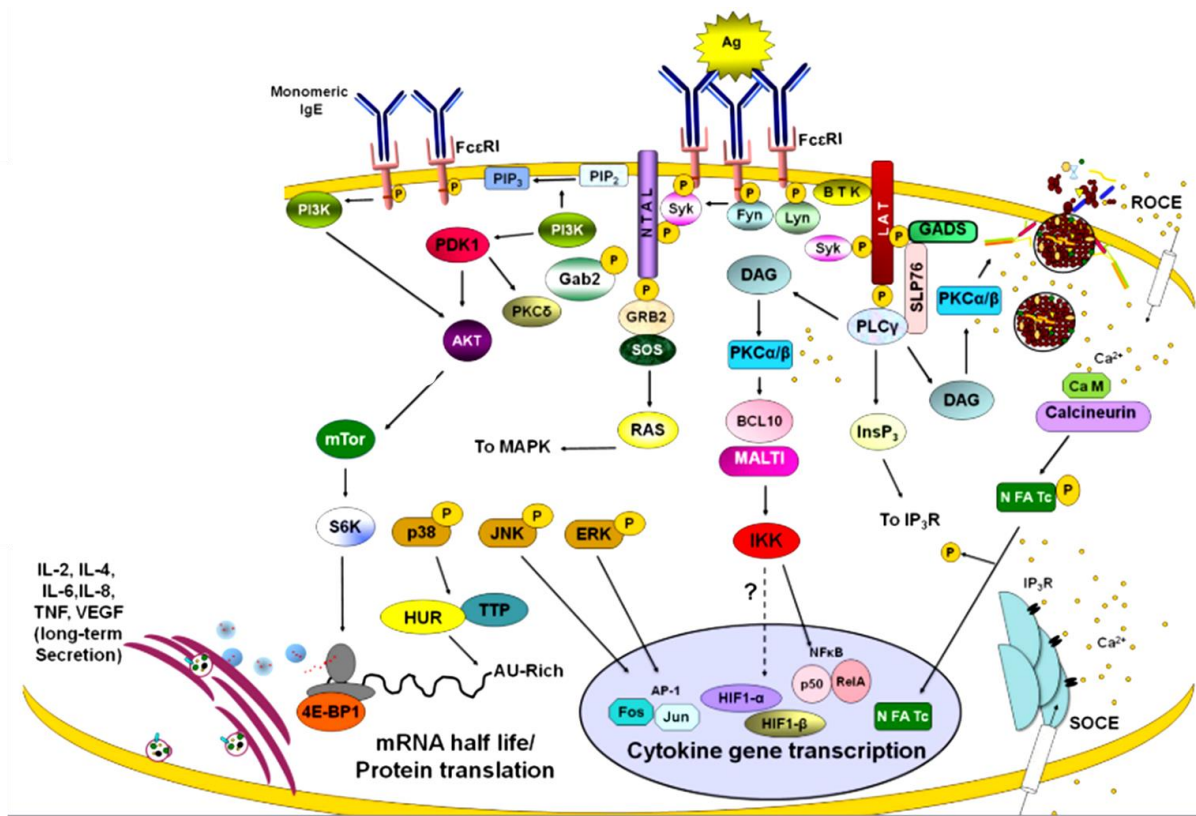


Figura 3. Principales vías de señalización activadas por el FcεRI en las MC. Un alérgeno multivalente induce el entrecruzamiento de dos IgEs unidas a los receptores FcεRI, llevando a cabo el entrecruzamiento necesario para activar las cascadas de señalización en el interior de la célula. En una vía primaria, la cinasa Lyn mediante la activación de Syk lleva a la activación de LAT. LAT es una proteína adaptadora que va a activar grandes complejos de señalización. LAT induce el aumento de calcio intracelular a través de la interacción con la PLC γ , quien, a su vez, fue fosforilada por la cinasa Syk. El calcio en el interior funciona como un segundo mensajero capaz de contribuir en los procesos de síntesis y liberación de citocinas, al igual que la síntesis de derivados lipídicos. En una segunda vía, la cinasa Fyn controla una

cascada de señalización en la que se activa PI3K. La PI3K activa a AKT y a PKC δ por acción de la PDK1. La PKC δ es muy importante para inducir el proceso de desgranulación al participar en el reacomodo del citoesqueleto. Fuente: adaptada de Ulrich, B. *et al.*, (2014).

Por otro lado, la segunda vía activada es iniciada por la tirosina cinasa Fyn. Después del entrecruzamiento del Fc ϵ RI, Fyn fosforila a un adaptador llamado GAB2 (Grb2-associated binding protein 2), el cual conduce a la activación de la fosfoinositido 3-cinasa (PI3K). Esto resulta en la activación de la proteína cinasa 1 dependiente de la PI3K (PDK1) y, por consecuencia en la activación de la proteína cinasa C δ (PKC δ) (Parravicini *et al.*, 2002). PKC δ es importante para inducir la desgranulación, por lo tanto, ambas vías de señalización son importantes para la liberación de citocinas (Figura 3). Ambas vías promueven la expresión de genes de citocinas y, por ende, su síntesis, ya que ambas vías activan factores de transcripción por acción de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs). La vía dependiente de la cinasa Lyn no es la única que induce la movilización y el aumento de Ca²⁺ citosólico, ya que cinasas de esfingosina (SPHKs) pueden ser activadas en la vía dependiente de Fyn por la fosfolipasa D (PLD) o por la misma cinasa Fyn. Esta activación de las SPHK promueve la entrada de Ca²⁺ extracelular, probablemente al fosforilar a la esfingosina y convertirla en esfingosina 1-fosfato (S1P) y así, disminuir el efecto supresor de la esfingosina en canales de Ca²⁺ operados por el vaciamiento de almacenes intracelulares (Olivera *et al.*, 2007).

Si bien, las vías de las cinasas Fyn y Lyn activan componentes comunes y específicos en las cascadas de transducción de señales, existe un enlace y un balance entre las dos vías para llevar a cabo las respuestas y funciones de las MC dependiendo de las condiciones en las que se encuentran. En el estudio realizado por Gonzalez-Espinosa *et al.*, 2003, los autores demostraron que, en células cebadas derivadas de médula ósea de ratones (BMMCs), a bajas concentraciones de dinitrofenil unido a albumina sérica humana, un antígeno artificial conocido como DNP-HSA, o un grado bajo de ocupación del receptor Fc ϵ RI se induce preferencialmente la expresión de genes de algunas quimiocinas, como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2) y la proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (MIP-1 β o CCL4), mientras que a altas concentraciones de Ag o un alto grado de ocupación del Fc ϵ RI, se induce la expresión de genes de citocinas como la IL-3, IL-4 e IL-6. Esos resultados indicaron que, la expresión de genes de citocinas es diferencial en función de la concentración de Ag y del grado de ocupación del receptor Fc ϵ RI. En este mismo estudio, los autores demostraron que la vía dependiente de la cinasa Fyn es esencial para inducir la expresión de genes de las quimiocinas a concentraciones bajas de Ag o baja ocupación del Fc ϵ RI, mientras que la vía dependiente de la cinasa Lyn es muy importante para inducir la expresión de genes de las citocinas estudiadas a concentraciones altas del Ag o a un grado mayor de ocupación. Conjuntamente, estos resultados demuestran que hay una expresión selectiva de algunos genes de citocinas en función de la vía de señalización activada, y que la liberación

diferencial de citocinas depende de la concentración de Ag, el grado de ocupación del receptor y de la vía de transducción de señales activada en tales condiciones (Figura 4).

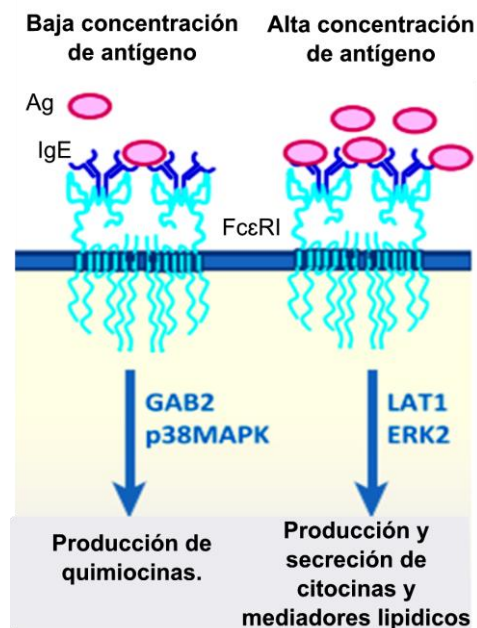


Figura 4. Respuestas celulares evocadas por las MC en función de la intensidad del estímulo antigénico. La concentración de un antígeno (Ag) de alta afinidad de unión al complejo IgE/FcεRI modula las respuestas de las MC. Una concentración baja de Ag (estímulo de baja intensidad), induce la producción de quimiocinas a través de la activación de GAB2 y p38MAPK en la vía de señalización desencadenada. Mientras que, una concentración alta de Ag (estímulo de alta intensidad), induce la producción de citocinas y su liberación junto con mediadores lipídicos, tales como leucotrienos y prostaglandinas, a través de la activación de LAT1 y ERK1/2 en la vía de señalización desencadenada. Fuente: adaptada de Bulfone-Paus, S. *et al.*, (2017).

1.3.1. Desgranulación inducida por el FcεRI en MC: la desgranulación anafiláctica.

Las MC pueden mediar las respuestas de la inmunidad adaptativa a través del receptor FcεRI. La desgranulación anafiláctica es un proceso que involucra la liberación completa del contenido granular minutos después de la estimulación de las MC (Blank & Rivera, 2004), lo que lleva a reacciones alérgicas graves. Este tipo de desgranulación se caracteriza por la fusión de gránulos secretores especializados (GSs) a la membrana plasmática para descargar completamente su contenido, incluso puede haber fusiones gránulo-gránulo para la formación de GSs de mayor tamaño y posteriormente fusionarse a la membrana plasmática. Cabe mencionar, que los gránulos citoplásmicos de las MC contienen mediadores químicos preformados, como histamina, serotonina y TNF- α , así como una gran variedad de proteasas como β -hexosaminidasa, quimasas y triptasas, los cuales son liberados de forma rápida y masiva. Esta liberación de mediadores preformados también inicia el reclutamiento a los sitios de invasión del patógeno, a la activación de los procesos de la inmunidad innata y respuestas inflamatorias (T. C. Moon et al., 2010). Seguida de la fase temprana de liberación comienza una fase tardía, donde ocurre la síntesis y producción de

citocinas *de novo* que posteriormente se van a liberar. Algunas de ellas son prostaglandinas, leucotrienos, incluso algunas citocinas proinflamatorias que se liberaron en la fase temprana, como el TNF- α (Gordon & Galli, 1990).

Un punto muy importante con respecto a los mecanismos de síntesis de ARNm y liberación de citocinas en MC es el requerimiento de un aumento de Ca^{2+} intracelular. Eglite *et al.*, 2003 estudiaron cómo la cinética de entrecruzamiento del complejo IgE/Fc ϵ RI regula aquellos eventos tardíos que genera, tales como la transcripción génica y síntesis de citocinas en una línea celular de MC de rata leucémica (RBL-2H3). En este caso, los autores propusieron que el aumento de Ca^{2+} intracelular inducido tras la agregación de los receptores Fc ϵ RI puede ser el causante especialmente de la expresión génica y síntesis de la quimiocina MCP-1 (o CCL2). Debido a estos resultados que indican una relación entre la movilización de calcio provocada por el Fc ϵ RI y la síntesis de citocinas específicas, la investigación sobre los procesos de aumento de calcio intracelular en las MC y su conexión con los eventos que llevan a la síntesis de ARNm para las citocinas es un campo muy activo de investigación en el área de los trastornos alérgicos.

1.4. El calcio como un segundo mensajero en las MC.

1.4.1. El calcio es un catión vital para la función celular.

El ion calcio juega un papel central en la fisiología celular, y en muchas células, funciona como un segundo mensajero central para la activación de diversas vías de transducción de señales. En células del músculo esquelético y cardíaco, el Ca^{2+} es esencial para la transmisión eléctrica (potencial de acción) y para llevar a cabo el proceso de excitación-contracción muscular (Bodi, Akhter, Schwartz, Mikala, & Koch, 2005). En neuronas, el Ca^{2+} juega un papel crítico en eventos tan diversos como la expresión de genes, la neurotransmisión y la plasticidad neuronal, fenómenos importantes para los procesos de memoria y aprendizaje (Berridge, 1998). En el caso de las funciones fisiológicas de las células del sistema inmune, como las MC, el Ca^{2+} es esencial para la desgranulación, la expresión de genes, el desarrollo, proliferación y migración (Suzuki, Inoue, & Ra, 2012; Feske, Wulff, & Skolnik, 2015). El Ca^{2+} también participa en los eventos moleculares que desencadenan la liberación de citocinas. Dichos eventos se derivan del aumento transitorio de Ca^{2+} intracelular, el cual puede ocurrir por diferentes mecanismos. Para esto, las MC expresan canales iónicos, transportadores y bombas permeables a Ca^{2+} en las membranas plasmática y de ciertos organelos. En conjunto, estos componentes son los encargados de regular la entrada y salida de Ca^{2+} a través en las células.

En la mayoría de los tipos celulares, incluyendo las MC, en un estado en reposo, la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se mantiene en bajos niveles (50-100 nM), mientras que la concentración fisiológica de Ca^{2+} extracelular se encuentra en altos niveles (1-2 mM). Sin

embargo, la estimulación del receptor FcεRI induce un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular que puede llegar hasta 1 μM. Los flujos de Ca²⁺ necesarios para el aumento de la [Ca²⁺]_i pueden provenir desde almacenes intracelulares, tal como el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria y/o directamente desde del exterior de la célula. Para esto las células expresan diferentes tipos de canales de Ca²⁺ en sus membranas.

1.4.2. Canales de Ca²⁺ expresados en células excitables y no excitables.

En células eucariontes existe una gran variedad de canales de calcio en la membrana plasmática cuya función es regular la entrada de Ca²⁺ extracelular. Estos canales incluyen a los canales de calcio dependientes de voltaje (VOCs o Ca_v), los operados por receptores (ROCs), los operados por segundos mensajeros (SMOCs) y los operados por almacenes intracelulares (SOCs) (Berridge, 1998). Por ejemplo, los ROCs son abiertos rápidamente por ligandos externos como neurotransmisores, tal es el caso de los receptores NMDA, y se encuentran principalmente en células excitables. Los SMOC se encuentran en algunas células excitables y células no excitables, y son activados por segundos mensajeros, como fosfatos de inositol, nucleótidos cíclicos y mensajeros derivados de lípidos (Reuter, 1983).

Las células excitables, incluidas neuronas, células musculares y endocrinas, expresan y requieren principalmente las funciones de los Ca_v, cuya función es generar una corriente entrante de Ca²⁺ necesaria para realizar diversas funciones fisiológicas (Simms & Zamponi, 2014). Por otra parte, las células no excitables, como las células del sistema inmune, entre ellas las MC, requieren principalmente de corrientes de Ca²⁺ a través de los SOCs para aumentar su [Ca²⁺]_i y llevar a cabo sus funciones fisiológicas (Hoth & Penner, 1992).

1.4.3. La corriente SOCE como la principal entrada de Ca²⁺ en MC.

La entrada de Ca²⁺ operada por almacenes intracelulares (SOCE) es el resultado del vaciamiento de Ca²⁺ almacenado principalmente en el retículo endoplásmico. Este mecanismo representa la fuente principal de Ca²⁺ intracelular en células no excitables y se descubrió en MC (Penner, Matthews, & Neher, 1988; Matthews, Neher, & Penner, 1989). La SOCE ocurre mediante la activación de los canales de Ca²⁺ activados por la liberación de Ca²⁺ (CRAC). Los CRAC (o también conocidos como ORAI) juegan un papel crítico en la inducción de la síntesis y liberación de citocinas en MC. La liberación de Ca²⁺ desde almacenes intracelulares se inicia por la activación de una gran variedad de receptores, entre ellos los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y los receptores con actividad tirosina cinasa (RTKs), como el FcεRI (Figura 5). Su activación lleva a su vez a la fosforilación y activación de la PLCγ para producir IP₃ e inducir la salida de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico hacia el citosol, dejando el interior del retículo endoplásmico con una concentración de Ca²⁺ por debajo de su valor en reposo, el cual se encuentra entre 400 y 600

nM (Mikoshiba & Hattori, 2000). El RE con bajos niveles de Ca^{2+} es la señal necesaria para iniciar la corriente SOCE a través de los canales CRAC en la membrana plasmática, provocando un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Convencionalmente, la corriente SOCE puede ser inducida farmacológicamente con inhibidores de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), como la tapsigargina (Tg).

Los canales CRAC se componen de la subunidad ORAI, la cual forma el poro selectivo a Ca^{2+} . ORAI junto con las moléculas de interacción estromal 1 y 2 (STIM1 y 2) regulan la activación de los canales CRAC, ya que las STIM son proteínas que se encuentran en la membrana del RE y funcionan como un sensor de los niveles de Ca^{2+} . Cuando el RE contiene muy bajas concentraciones de Ca^{2+} , las STIM se trasladan rápidamente hacia uniones especializadas del RE cercanas a la membrana plasmática para acoplarse con la subunidad ORAI1 de los canales CRAC, induciendo su apertura y por ende, la entrada de Ca^{2+} (Roos et al., 2005; Do Heo et al., 2005). Por otra parte, estudios recientes indican que la entrada de Ca^{2+} en MC también puede ocurrir independientemente del vaciamiento de almacenes intracelulares (corriente no SOCE) y que canales Ca_v , como los canales de calcio de tipo L (CCTL) posiblemente son algunos de los responsables de mediar esta entrada de Ca^{2+} (Heizer, Davenport, Schmitz, Perraud, & Li, 2015; Suzuki, Inoue, & Ra, 2010).

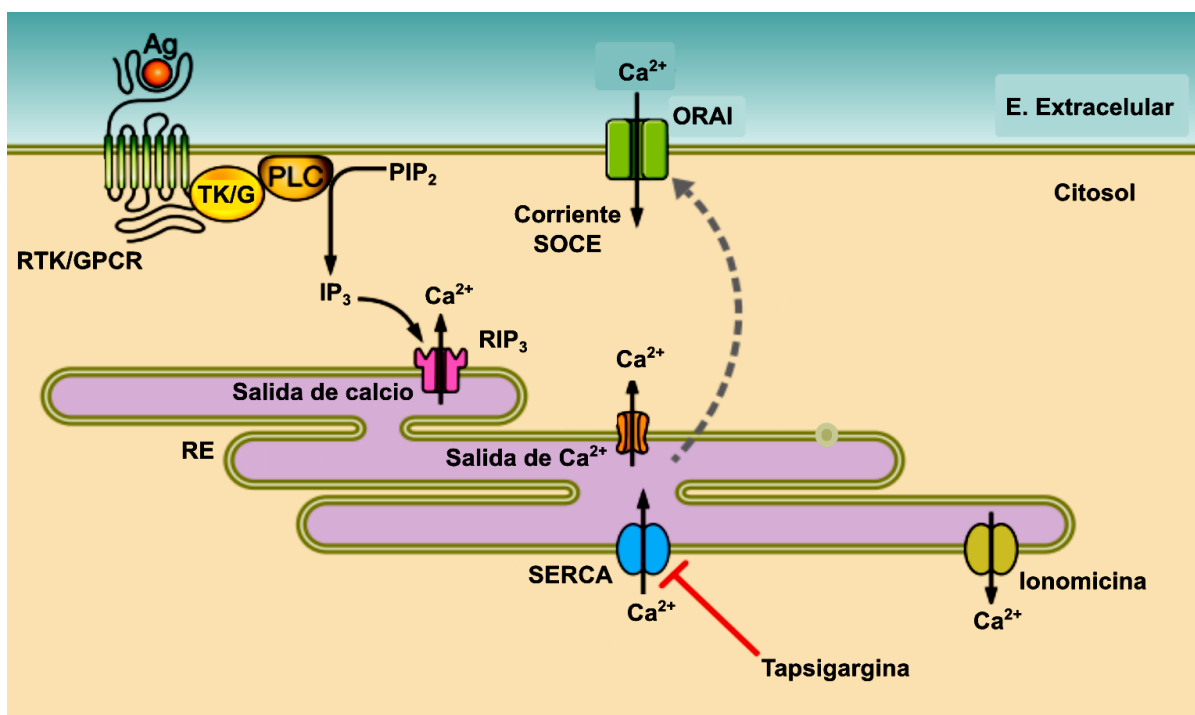


Figura 5. Entrada de calcio operada por la salida de calcio de almacenes intracelulares. La corriente SOCE se induce cuando un estímulo externo (ligando) se une a un receptor con actividad de cinasa de tirosinas (RTK) o a un receptor acoplado a proteínas G (GPCR). Una tirosina cinasa (TK) o una proteína G (G) activará, a su vez, a la fosfolipasa C (PLC), una enzima que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) de la membrana plasmática para

generar inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). Este segundo mensajero se une a receptores de IP₃ (RIP₃) localizados en el retículo endoplásmico (RE), los cuales se abren y permiten el flujo de Ca²⁺ desde el interior del RE hacia el citosol. Esta es la señal necesaria para que los canales ORAI localizados en la membrana plasmática se activen y permitan la entrada Ca²⁺ desde el espacio extracelular. La tapsigargina es un fármaco que no permite el retorno del Ca²⁺ hacia el RE al inhibir la función de la ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico (SERCA). Fuente: adaptada de Prakriya, M., & Lewis, R. (2015).

1.4.4. Canales de calcio dependientes de voltaje: estructura y clasificación.

Los canales de Ca²⁺ activados por voltaje (Ca_v) se clasifican principalmente en dos grupos: los canales activados por alto voltaje (HVA), que se abren en respuesta a despolarizaciones sostenidas de membrana y canales activados por bajo voltaje (LVA), que se activan a potenciales cercanos al potencial de membrana de neuronas en reposo (Armstrong & Matteson, 1985). Los Ca_v se componen de 5 subunidades (Figura 6a); una subunidad principal transmembrana α₁ (Ca_vα₁) de 190 kDa, cuya función es formar el poro de conducción de Ca²⁺, contiene el sensor de voltaje y el sistema de apertura del canal y contiene los sitios de unión para la mayoría de los moduladores y bloqueadores farmacológicos. α₁ se encuentra asociada a subunidades auxiliares, como el dímero α₂δ unidos por puente disulfuro de 170 kDa, una subunidad β intracelular fosforilada de 55 kDa y una subunidad transmembrana γ de 33 kDa (solo identificado en Ca_v de células del musculo esquelético y cardiaco) (Takahashi, Seagart, Jones, Reber, & Catterall, 1987).

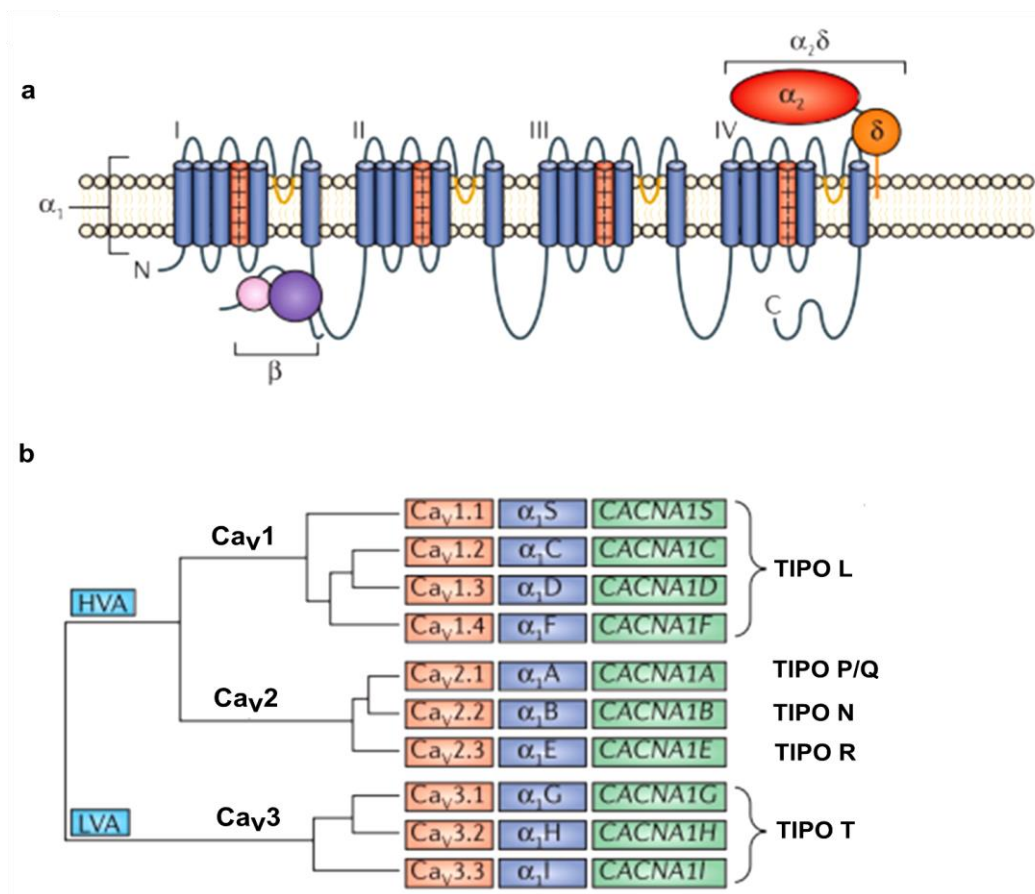


Figura 6. Estructura y clasificación de los canales Ca_v . a) Subunidades que componen a los Ca_v . La subunidad α_1 contiene 4 dominios transmembrana compuestos a su vez de 6 segmentos cada uno. α_1 conforma el poro del canal y contiene los sitios de unión a la mayoría de los moduladores farmacológicos. Las subunidades auxiliares β y $\alpha_2\delta$ pueden o no formar parte del complejo del canal de calcio y se encargan de modular sus propiedades biofísicas. b) Clasificación de los Ca_v en función de la isoforma de la subunidad α_1 que los compone (recuadros naranjas y azules). El nombre de gen que codifica para cada una de las isoformas de α_1 se muestra en los recuadros verdes. Fuente: adaptada de Dolphin, A. (2012).

A pesar de que las subunidades auxiliares modulan las propiedades del canal, la diversidad farmacológica y electrofisiológica de los Ca_v se encuentra principalmente en la existencia de 10 diferentes isoformas de la subunidad α_1 en células de mamíferos. Debido a esto, las corrientes de Ca^{2+} se han clasificado en función de sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas. Hay 3 familias de subunidades $Ca_v\alpha_1$, denominadas Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 , donde cada uno tiene varios miembros (Figura 6b). De acuerdo con la nomenclatura, la subfamilia Ca_v1 incluye a los canales que contienen las isoformas α_{1S} ($Ca_v1.1$), α_{1C} ($Ca_v1.2$), α_{1D} ($Ca_v1.3$) y α_{1F} ($Ca_v1.4$), las cuales median las corrientes de Ca^{2+} tipo L. La subfamilia Ca_v2 incluye a los canales que contienen a α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} ($Ca_v2.1$ - $Ca_v2.3$), los cuales median las corrientes de Ca^{2+} de tipo P/Q, tipo N y tipo R, respectivamente. Mientras que la subfamilia Ca_v3 incluye a los canales que contienen a α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} ($Ca_v3.1$ - $Ca_v3.3$), los cuales median las corrientes de Ca^{2+} de tipo T (Catterall, Perez-Reyes, Snutch, & Striessnig, 2005). Los Ca_v1 o canales de Ca^{2+} de tipo L (CCTL) tienen ciertas propiedades biofísicas y farmacológicas que los caracterizan. Necesitan de una fuerte despolarización para su activación (~ -20 mV) y son bloqueados por bajas concentraciones de dihidropiridinas (DHPs) (ej. nifedipina), benzodiazepinas y fenilalquilaminas. Por lo tanto, de manera común se dice que son canales de Ca^{2+} sensibles a DHPs.

1.4.5. Los canales de Ca^{2+} tipo L como nuevos e importantes participantes en la función de MC.

Hay evidencia de que una corriente diferente a la SOCE regula la entrada extracelular de Ca^{2+} en MC para modular funciones dependientes de Ca^{2+} . No obstante, se ha puesto poca atención a las funciones de dicha corriente, probablemente porque se ha pensado convencionalmente que la estimulación vía Fc ϵ RI y el vaciamiento de Ca^{2+} del RE con Tg inducen modos similares de influjos de Ca^{2+} . Sin embargo, la estimulación vía Fc ϵ RI, pero no vía Tg, induce una corriente grande diferente a la SOCE. Esta corriente es inhibida por el inactivador de CCTL, Nifedipina, y a su vez, potenciada por un activador de estos canales, el (S)-Bay K8644 (Suzuki, Yoshimaru, Inoue, Nunomura, & Ra, 2008). Estas observaciones permitieron pensar que las MC podrían estar expresando CCTL en su superficie y cumplir funciones vitales en las respuestas inmunológicas mediadas por las MC. Yoshimaru *et al.*, 2009 reportaron la expresión del ARNm de la subunidad α_{1C} (correspondiente a la isoforma $Ca_v1.2$ de CCTL) en células cebadas derivadas de la médula

ósea (BMMCs) de ratón, en células cebadas RBL-2H3, y en una línea de células cebadas humanas, LAD-2. De igual forma reportaron la expresión del ARNm, pero en menor cantidad, de la subunidad α_{1D} ($Ca_v1.3$) mediante el análisis de RT-PCR. Además, aportaron datos que apoyan una posible inducción de la actividad de los CCTL tras la activación del complejo IgE/Fc ϵ RI. Esta no ha sido la única ocasión en la que se ha demostrado la función de los Ca_v1 en células del sistema inmune. Previamente se reportó que los linfocitos T expresan canales Ca_v1 en su membrana plasmática, que controlan el aumento del Ca^{2+} intracelular tras la activación del receptor de células T (TCR). Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Omilusik et al., 2011, donde los autores demostraron que linfocitos T naive que no expresan la subunidad α_{1F} del $Ca_v1.4$ (*cacna1f*^{-/-}) presentan un menor incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por la activación del TCR en comparación con linfocitos T naive que si expresan al $Ca_v1.4$. Además, los linfocitos T *cacna1f*^{-/-} presentan una deficiencia para diferenciarse a linfocitos T CD4⁺ tras la activación del TCR, por lo que, hay un menor número de linfocitos T CD4⁺. Esto demuestra un papel importante de los CCTL sobre las funciones de linfocitos T. Diversas células del sistema inmune expresan CCTL funcionales, entre las que destacan las células NK (Zocchi, Rubartelli, Morgavi, & Poggi, 1998), macrófagos (Antony, Mehto, Tiwari, Singh, & Natarajan, 2015; Sharma et al., 2016) y linfocitos B (Akha et al., 1996; Grafton, Stokes, Toellner, & Gordon, 2003).

Si bien se han observado variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en MC debido a una corriente entrante a través de CCTL tras la estimulación del complejo IgE/Fc ϵ RI, los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno no han sido establecidos. Por esta razón, es importante estudiar los eventos que subyacen a la activación de los CCTL iniciada por el entrecruzamiento de los receptores Fc ϵ RI en MC. El conocimiento generado a partir de este tipo de estudios servirá para tratar de identificar en un futuro blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos fármacos como nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades alérgicas o enfermedades autoinmunes.

1.4.6. Mecanismo de apertura de los CCTL en MC: ¿son sensibles al voltaje?

Estudios realizados con colorantes sensibles a los cambios de voltaje de la membrana plasmática (como el *bis-oxonol*) han demostrado que la activación de MC a través del Fc ϵ RI induce despolarización membranal, el cual alcanza su máximo en tan solo 1 minuto, seguido por repolarización, pero la célula no alcanza una hiperpolarización. Dicho fenómeno dura cerca de 2 minutos, lo que difiere en la duración de milisegundos de un potencial de acción y entradas sinápticas excitatorias en células excitables (Yoshimaru et al., 2009). A manera de analogía, se esperaría que los CCTL expresados en MC se activaran en una manera dependiente de voltaje, como ocurre convencionalmente en células excitables. Sin embargo, este es un tema controversial. Por un lado, la adición de altas concentraciones de K^+ extracelular causa un ligero aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en MC (Yoshimaru et al., 2009). Este fenómeno también ha sido observado

en linfocitos T CD4⁺ (Badou et al., 2006), y sugiere una dependencia muy baja al cambio de voltaje. Sin embargo, la despolarización mediada por alto K⁺ induce una entrada robusta de Ca²⁺ en las mitocondrias de MC (Yoshimaru et al., 2009). De manera interesante, la despolarización mediada por alto K⁺ induce una entrada robusta de Ca²⁺ intracelular solo cuando la actividad de los canales CRAC se bloquea farmacológicamente, es decir, la dirección hacia el citosol o hacia las mitocondrias del influjo de Ca²⁺ a través de canales sensibles al voltaje podría depender del estado de activación de los canales CRAC. Además, este influjo de Ca²⁺ es sensible a inactivadores y activadores específicos de CCTL (como las DHPs) y disminuidos por desregulación de la expresión de CCTL, específicamente Ca_v1.2 en BMMCs (Yoshimaru et al., 2009). De esta manera, puede ser posible que los CCTL en MC sean activados de una manera dependiente de voltaje en respuesta a una despolarización de la membrana plasmática sobre la estimulación del receptor FcεRI.

2. GENERALIDADES DEL PROYECTO.

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Las reacciones de hipersensibilidad son respuestas nocivas producidas por el sistema inmune. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I o inmediata se caracterizan por la producción elevada de IgE inducida incluso por la exposición a alérgenos inocuos. La IgE se une al FcεRI expresado en la membrana plasmática de células cebadas, sensibilizándolas. La exposición de las MC a alérgenos entrecruza a los complejos IgE/FcεRI lo que induce la liberación rápida de citocinas preformadas y expresión génica, síntesis y liberación de citocinas *de novo* en una fase tardía (Tae Chul Moon, Dean Befus, & Kulka, 2014).

Por otro lado, se ha estudiado y caracterizado a la corriente SOCE como la principal corriente de Ca²⁺ requerida para que las MC cumplan sus funciones celulares, incluida la exocitosis de los mediadores bioactivos que promueven la respuesta inflamatoria de MC (Wajdner et al., 2017). Sin embargo, el hallazgo de que las MC expresan subunidades α₁ de CCTL y la creciente evidencia que ha surgido en los últimos años sobre su posible papel en las respuestas mediadas por el receptor FcεRI (Suzuki et al., 2008; Yoshimaru et al., 2009), nos lleva a reconsiderar el argumento de que estos canales sólo son usados por células excitables para cumplir sus funciones. Además, las funciones de la corriente de Ca²⁺ tipo L para la expresión génica, síntesis y liberación de citocinas y otros mediadores en MC sigue sin conocerse. Adicionalmente, el mecanismo molecular por el cual el FcεRI podría estar induciendo la activación de CCTL en MC no ha sido estudiado.

Por estas razones el presente proyecto tuvo como finalidad estudiar el papel de los CCTL en la activación de MC a través del FcεRI, y ampliar el conocimiento que se tiene sobre las funciones

de la corriente de Ca^{2+} sensible a DHPs y aportar evidencia sobre el mecanismo que subyace la activación de dichos canales en MC.

2.2. HIPÓTESIS.

La estimulación de BMMCs a través del receptor FcεRI con diferentes concentraciones de antígeno (DNP-HSA) inducirá una corriente entrante de Ca^{2+} ($I_{Ca^{2+}}$) sensible a la dihidropiridina nifedipina de una manera dependiente de la activación de cinasas de la familia de Src. Ésta $I_{Ca^{2+}}$ sensible a nifedipina contribuirá al aumento del ARNm de las citocinas CCL2, IL-6 e IL-3.

2.3. OBJETIVOS.

2.3.1. Objetivo general

Evaluar la inducción y la función de la $I_{Ca^{2+}}$ sensible a nifedipina a través de la membrana plasmática de BMMCs de ratón en respuesta a diferentes niveles de activación del receptor FcεRI, analizando la participación de cinasas de la familia de Src en la inducción de dicha $I_{Ca^{2+}}$ y, la posible importancia de este último en el aumento de la acumulación de ARNm de las citocinas CCL2, IL-6 e IL-3.

2.3.2. Objetivos particulares.

1. Estandarizar los protocolos experimentales y parámetros técnicos para el registro de corrientes aisladas, mediante la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa en modalidad de fijación de voltaje en BMMCs.
2. Determinar la respuesta máxima de la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por diferentes concentraciones de DNP-HSA y determinar su grado de sensibilidad a nifedipina en BMMCs con el uso de la técnica de patch clamp.
3. Determinar la participación de las cinasas Lyn y Fyn en la activación de los CCTL inducida por el FcεRI en BMMCs Lyn^{-/-} y BMMCs Fyn^{-/-} con el uso de la técnica de patch clamp.
4. Evaluar el aumento de la expresión de RNAm de CCL2, IL-3 e IL-6 frente a diferentes concentraciones de antígeno en BMMCs mediante el uso de la técnica de RT-PCR.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

- **Objetivo particular 1.** Se generaron células cebadas derivadas de la medula ósea de ratones (BMMCs, ver Materiales y Métodos) en medio de cultivo RPMI y se sensibilizaron toda la noche con 100 ng/ml de IgE monoclonal dirigida contra dinitrofenol (DNP). Las células fueron adheridas en portaobjetos electrocargados. Posteriormente, las células se llevaron a la plataforma de registro del setup de patch clamp, donde se perfundieron continuamente con solución extracelular estándar (Figura 7A). En este punto, se realizó el giga-sello en cada célula con la pipeta de registro generando presión negativa (succión), estando en todo

momento en la configuración de fijación de voltaje. Posteriormente, se accedió al interior de la célula y se aplicaron pequeños pulsos de +5 mV de manera creciente hasta que la medición de la corriente en el amplificador fuera de 0.0 pA. En este momento, se obtuvo el registro de las propiedades pasivas de BMMCs, como su potencial de membrana en reposo (PMR) y su capacitancia membranal (C_m) basal. La ejecución de estos experimentos buscó la importancia de establecer estos parámetros en todos los registros electrofisiológicos que se realizaron a partir de este punto para obtener registros confiables en BMMCs, así como la validación de la estrategia de estimulación inducida por DNP-HSA a concentraciones de 1 y 10 ng/ml a través de cambios en la C_m .

- **Objetivo particular 2.** Al igual que en el objetivo particular previo se utilizaron BMMCs WT sensibilizadas con IgE. Los experimentos para la obtención de los registros de corriente se dividieron en los siguientes grupos (Figura 7B):
 - a) El primer grupo de experimentos se realizó con células en solución extracelular estándar conteniendo Ca^{2+} (3 mM) con el objetivo de observar corrientes de Ca^{2+} . Se obtuvieron registros de cada célula en 2 condiciones diferentes. Primero se realizaron experimentos donde la célula fue perfundida con la solución extracelular durante 3 minutos utilizando un protocolo de rampa de voltaje para obtener la amplitud de la corriente basal. Posteriormente, la célula fue perfundida con una solución de 1 ng/ml o 10 ng/ml de DNP-HSA (utilizando la misma solución extracelular) y se registró utilizando el mismo protocolo (por un tiempo de 6 min o 360 s) para observar el efecto del antígeno en ambas concentraciones sobre la corriente basal de la célula. Con estos experimentos se pudo determinar la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ (respuesta máxima) para ambas concentraciones de antígeno.
 - b) El segundo grupo de experimentos constó en la obtención de registros de cada célula en 3 condiciones diferentes: **1)** perfundida con solución extracelular (amplitud de la corriente basal), **2)** perfundida con una solución de DNP-HSA (1 o 10 ng/ml) y, **3)** perfundida con una solución de nifedipina 10 μ M y DNP-HSA (1 o 10 ng/ml). Una vez determinadas la amplitud de la corriente basal (180 s) y la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ con DNP-HSA (360 s), se perfundió a la célula en una solución de nifedipina 10 μ M con la concentración de antígeno correspondiente (para descartar un posible efecto por el lavado del antígeno). De tal manera que, con los resultados de estos experimentos se determinó el grado de sensibilidad de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ máxima inducida por DNP-HSA (en ambas concentraciones) a la nifedipina en un tiempo de 540 s o 9 min. Con los resultados obtenidos del inciso a) y b) se pudo determinar el comportamiento de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ máxima inducida por DNP-HSA en ausencia y en presencia de nifedipina en función del tiempo (tiempo total de 1100 s o 18 min).
 - c) Un tercer grupo de experimentos se realizó de la misma manera que el segundo grupo, pero en este caso con una solución extracelular con Ba^{2+} y sin Ca^{2+} . En este conjunto de

experimentos primero se registró la corriente basal (180 s), después la corriente entrante de Ca^{2+} inducida con DNP-HSA 1 o 10 ng/ml (180 s) en la solución extracelular estándar que contiene una concentración de Ca^{2+} 3 mM y, posteriormente se registró la corriente de Ba^{2+} ($I_{\text{Ba}^{2+}}$) inducida por ambas concentraciones de DNP-HSA en una solución 10 mM de Ba^{2+} sin Ca^{2+} por 720 s o 12 min. El objetivo de sustituir el Ca^{2+} por Ba^{2+} en la solución extracelular es crítico, debido a que los canales iónicos selectivos a calcio presentan una conductancia mayor al Ba^{2+} , por lo que esto nos permitió demostrar en este trabajo que las corrientes obtenidas de los registros en BMMCs son de Ca^{2+} .

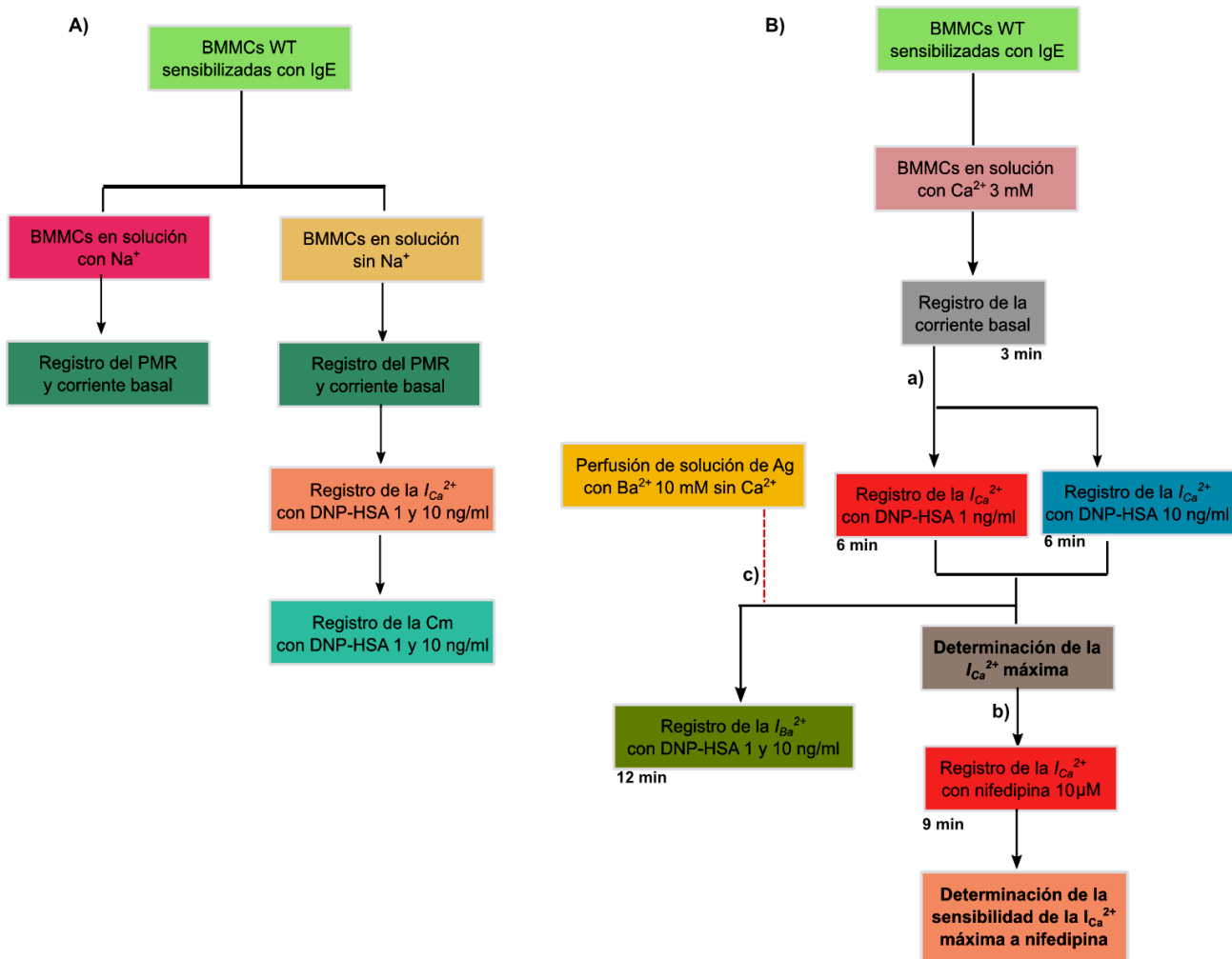


Figura 7. Diagrama del diseño experimental de registros electrofisiológicos en BMMCs WT. A) Se muestra la serie de pasos que se siguieron para cumplir con el objetivo particular 1. B) Se muestra la serie de pasos que se siguieron para cumplir con el objetivo particular 2, a) para registrar la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ inducida por 1 y 10 ng/ml de Ag, y así, determinar la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ máxima y b) su sensibilidad a nifedipina. En c) se muestra la serie de pasos que se siguieron para registrar la $I_{\text{Ba}^{2+}}$ inducida por 1 y 10 ng/ml de Ag.

- **Objetivo particular 3.** Se utilizaron BMMCs de ratones $\text{Lyn}^{-/-}$ y BMMCs de ratones $\text{Fyn}^{-/-}$ (ver materiales y métodos) y se realizaron experimentos de la misma manera en la que se realizaron los experimentos de los incisos a y b del objetivo particular 2 para estudiar el posible papel de ambas cinasas sobre la amplitud de la corriente entrante inducida por DNP-HSA y el grado de

sensibilidad de dichas corrientes por la Nifedipina en estas células. Con el objetivo de obtener una primera evidencia sobre el mecanismo de activación de los CCTL sensibles a dihidropiridinas en BMMCs tras su activación mediante el FcεRI.

- **Objetivo particular 4.** Se utilizó una cantidad de 18×10^6 de BMMCs WT en medio de cultivo previamente sensibilizadas con IgE anti-DNP y se mantuvieron en una incubadora a 37°C toda la noche. Después las células se colectaron y resuspendieron en buffer Tyrode's BSA. Se centrifugaron a 1,500 rpm por 4 min a 25°C y se colocó 1 ml de muestra en un tubo (7 tubos o muestras en total), que contenía aproximadamente 2×10^6 células cada uno. Las condiciones de cada muestra se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales de cada muestra para la extracción de ARNm total.

Muestra	Vehículo (DMSO)	DNP-HSA	Nifedipina
1	-	-	-
2	0.1%	-	-
3	0.1%	1 ng/ml	-
4	0.1%	10 ng/ml	-
5	0.1%	1 ng/ml	10 μM
6	0.1%	10 ng/ml	10 μM
7	0.1%	-	10 μM

Nota: Todas las muestras se incubaron a 37°C con DNP-HSA por el tiempo de respuesta máxima establecido en los registros electrofisiológicos. La nifedipina se añadió antes del DNP-HSA de igual manera por el tiempo de inhibición máxima establecido en los registros electrofisiológicos.

Finalmente, se extrajo el ARNm total de las BMMCs y se realizó RT-PCR para identificar el efecto inducido por la nifedipina sobre la acumulación de los genes de CCL2, IL-3 e IL-6 inducida por DNP-HSA (1 y 10 ng/ml).

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Animales.

Se utilizaron ratones C57BL/6J WT (número de stock 000664), *Fyn*^{-/-} (número de stock 003204) y *Lyn*^{-/-} (número de stock 002271) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y en condiciones estériles en la unidad para la producción y uso de animales de laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Cinvestav (protocolo 00137-15).

4.2. Cultivo de BMMCs.

Se aislaron los precursores de células cebadas de la médula ósea de las tibias de ratones C57BL/6J como se describió por Meurer et al.,(2016) y se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con los siguientes reactivos: Suero fetal bovino (FBS) al 10% (Gibco), aminoácidos no esenciales (NEAA 1X), penicilina-estreptomicina 100 IU/ml y piruvato de sodio 1 mM (Thermo Fisher Scientific), HEPES 25 mM y β -mercaptoetanol 50 μ M (Sigma Aldrich). Adicionalmente, se agregó al medio de cultivo IL-3 (20 ng/ml) (PreproTech, Rocky Hill, NJ) para inducir la diferenciación y maduración de los precursores hacia células cebadas (BMMCs).

Las BMMCs se diferenciaron cambiando el medio de cultivo cada 8 días, recolectando aquellas células no adherentes y resuspendiéndolas en medio de cultivo fresco. Para cada experimento se usaron cultivos con un tiempo mínimo de madurez de 5 semanas después de su aislamiento de la médula ósea. A este tiempo de madurez el 98% de las BMMCs en el cultivo expresan al Fc ϵ RI. Los cultivos de BMMCs se mantuvieron en todo momento a una temperatura de 37°C en una incubadora marca Binder con una atmosfera de 5% CO₂. El buffer Tyrode's BSA utilizado para los experimentos de RT-PCR contenía: NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 5.6 mM, albumina sérica bovina (BSA) al 0.05% y HEPES 20 mM [pH 7.4] (todos de Sigma Aldrich).

4.3. Genotipos.

Para determinar el genotipo de los ratones C57BL/6J WT y Lyn^{-/-} se tomó una biopsia de la cola de los ratones y se digirieron en 0.7 ml de solución detergente SNET [pH 8.0] a 57°C durante toda la noche. Posteriormente, se trituró la cola con ayuda de unas tijeras de disección. Para extraer el ADN se adicionaron 400 μ L de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, Sigma Aldrich) y se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C por 15 minutos. Se transfirieron 500 μ L de la fase acuosa en tubos nuevos y se les añadió 400 μ L de isopropanol frio (Sigma Aldrich), se incubaron en hielo seco durante 15 minutos y se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C por 15 minutos. Los pellets obtenidos se lavaron con 500 μ L de etanol (J.T. Baker), se dejaron en hielo durante 5 minutos y se centrifugaron a 14 000 rpm a 4°C por 5 minutos. El pellet de ADN se resuspendió en 50 μ L de agua DEPC (dietilpilocarbonato).

Una vez obtenido el ADN de cada cola se realizaron diluciones 1:100 de cada muestra y se tomaron 2 μ L para realizar la amplificación del gen de la cinasa Lyn y del casete Neo por RT-PCR en un termociclador Mastercycler marca Eppendorf utilizando las siguientes condiciones: 95°C por 5 min, 94°C por 3 min; 36 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos, con una extensión al protocolo a 72°C por 2 min, para al final mantener a 4°C. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen del casete de Neomicina fueron: 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3' (sentido) y 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' (anti-sentido),

mientras que los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de las cinasas Lyn y Fyn fueron mandados a sintetizar a Sigma-Aldrich, utilizando las secuencias especificadas por The Jackson Laboratory. Por último, los fragmentos fueron separados en geles de agarosa-TBE al 2%. Se cuantificaron los productos separados del gel aplicando bromuro de etidio y se analizaron en el equipo miniBis Pro (Bio-imaging Systems) con una exposición negativa para la cuantificación de densitometría.,

4.4. Reactivos.

La nifedipina, el Dimetilsulfóxido (DMSO), el 2-4-Dinitrofenol conjugado a albúmina sérica humana (DNP-HSA) y la IgE monoclonal de ratón anti-DNP se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

4.5. Registros electrofisiológicos.

Para la obtención de los registros por técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa, se utilizó una solución extracelular estándar con la siguiente composición en mM: 140 NaCl, 2.8 KCl, 2 MgCl₂, 5.6 Glucosa, 3 CaCl₂ y 10 HEPES con un pH ajustado a 7.2 (Trizma), y una osmolaridad de 290 ± 10 mOsm/kg. Esta solución se utilizó únicamente en los registros electrofisiológicos del objetivo particular 1. También se utilizó una solución extracelular con la misma composición iónica a la solución estándar, a excepción de que se sustituyó el NaCl₂ por 120 mM N-metil-D-Glucamina (NMDG) y 20 mM Cloruro de Tetraetilamonio (TEA-Cl) y se registraron BMMCs WT. Para los experimentos en BMMCs WT, Lyn^{-/-} y Fyn^{-/-} se utilizó una solución intracelular estándar dentro de la pipeta de registro que contiene (en mM): 10 NaCl, 1 MgCl₂, 0.0001 CaCl₂, 140 Cs-MeSO₃, 1 EGTA, 0.5 Na₂ATP y 10 HEPES con un pH ajustado a 7.2 (Trizma), y una osmolaridad de 290 ± 10 mOsm/kg. La solución extracelular para aislar corrientes de Ca²⁺ contiene una concentración 3 mM de CaCl₂ y se sustituyó el NaCl 140 mM por 120 mM NMDG y 20 de mM TEA-Cl. La solución extracelular para los registros de las corrientes de Ba²⁺ contiene una concentración 10 mM de BaCl₂ en lugar de 3 mM de CaCl₂ y con los mismos componentes que contiene la solución extracelular de Ca²⁺. Las pipetas de registro se hicieron de capilares de borosilicato (diámetro interior: 0.86 mm, diámetro exterior: 1.5 mm, longitud: 10 cm), los cuales tuvieron una resistencia final de 8-12 MΩ usando un pulidor de micropipetas Flaming/Brown (Modelo P-97; Sutter Instrument CO).

El volumen de BMMCs en cultivo que se utilizó en cada registro fue de 30 µL y se colocó en un portaobjetos electrocargado (Kling-On HIER Slides; Biocare Medical) con un área de 1 cm² para adherirlas. Las BMMCs adheridas en porta objetos se observaron en un microscopio Nikon FN-S2N (Nikon, Tokio) acoplado a una cámara infrarroja de contraste de interferencia, con un objetivo de inmersión 40X. Los registros de corriente se llevaron a cabo en la configuración de fijación de voltaje a temperatura ambiente 23-25°C, utilizando un amplificador Axopatch 1D (Axon

Instruments, Union City, CA). Las señales fueron filtradas a 5 kHz, digitalizadas a 10 kHz mediante una Digidata 1440A (Axon Instruments) y almacenadas con el programa pClamp v10.3. Únicamente se tomaron en cuenta aquellos registros que cumplieron con los criterios de inclusión:

- La resistencia de acceso final ($R_{acc/f}$) no varió más de un 20% con respecto a la resistencia de acceso inicial ($R_{acc/i}$) durante todo el experimento, es decir, $R_{acc/f} = R_{acc/i} \pm (R_{acc/i} * 0.2)$.
- Donde la corriente de fuga no excedió los 20 pA durante todo el experimento.

Antes de realizar los experimentos se midió el potencial de membrana en reposo (PMR) y la capacitancia de la membrana (C_m) de las BMMCs. Todos los experimentos se realizaron en la modalidad de fijación de voltaje. Para los experimentos del objetivo particular 1, se aplicó un protocolo de rampas de voltaje de -80 mV a +30 mV con una duración de 2 s (velocidad de la rampa = 0.05 mV/ms), empleadas cada 9 s desde un potencial de voltaje fijo de 0 mV de las cuales se obtuvieron curvas I-V.

Para registrar el cambio en la amplitud de la corriente inducida por DNP-HSA (1 y 10 ng/ml) en función del tiempo en BMMCs WT y $Lyn^{-/-}$ y $Fyn^{-/-}$, se aplicó un protocolo de rampas de voltaje desde -80 mV a +60 mV con una duración de la rampa de 2 s (velocidad de la rampa = 0.07 mV/ms) y 9 s entre la aplicación de una rampa y la siguiente. Se obtuvieron los registros de la amplitud de la corriente basal a -80 mV por 3 min y posteriormente por 15 min para registrar los cambios en la amplitud de la corriente entrante de Ca^{2+} inducidos por DNP-HSA.

Para registrar los cambios en la amplitud de la corriente en la respuesta máxima inducida por DNP-HSA (1 y 10 ng/ml) con nifedipina 10 μ M en BMMCs WT, se registró por 3 min la amplitud de la corriente basal, seguido del registro por 6 min de la amplitud de la corriente inducida por DNP-HSA, y por último la amplitud de la corriente entrante máxima de Ca^{2+} en presencia de nifedipina por 9 min. Todos los registros obtenidos de los experimentos se analizaron con el programa Clampfit v11.0.3.

4.6. Extracción de ARNm y RT-PCR.

Se extrajo el ARNm total de 2×10^6 BMMCs WT usando TRI-Reagent (Sigma Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ARNm se resuspendió en una solución de RNA Secure (Ambion) para asegurar la integridad de la muestra. Se cuantificó la concentración de ARNm extraído en μ g/ μ l y se evaluó su integridad (relación 260/280 nm) con la ayuda del Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Para realizar la RT-PCR, primero se sintetizó el ADNc utilizando el kit First Strand cDNA synthesis (FSDS) (Invitrogen) a partir del ARNm extraído, siguiendo las instrucciones del proveedor. Después, se realizó una mezcla de los componentes que contiene el kit Second Strand cDNA

Synthesis (SSDS) (Invitrogen), al cual se le adicionó los primers de las citocinas de interés (ver Tabla 2 para mayor especificación) y 4 µl de la solución generada con el kit FSDS. De la solución resultante se realizó la RT-PCR en un termociclador Mastercycler marca Eppendorf utilizando las siguientes condiciones: 96°C por 3 min, 2 ciclos de 96°C por 1 min y 60°C por 4 min; 22 ciclos (CCL2 y GAPDH), 28 ciclos (IL-6) o 35 ciclos (IL-3) de 94°C por 1 min, 60°C por 2.5 min y 72°C por 4 min, con una extensión al protocolo a 70°C por 10 min, para al final mantener a 4°C.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis de ADN de las proteínas de interés de BMMCs.

Compuesto	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Marca
CCL2	5'-ACTGAAGCCAGCT CTCTCTT-3'	5'-TTCCTTCTTGGGGTCA GCAC-3'	Sigma Aldrich
IL-3	5'-GATACCCACCGTTTAA CCAGAACGTTG-3'	5'-TCCACGGTTAGGAGAG ACGGAG-3'	Lofstrand Labs Limited
IL-6	5'-ATGAAGTTCCTCTCT GCAAGAGACT-3'	5'-CACTAGGTTGCCGAGTA GATCTC-3'	Lofstrand Labs Limited
GAPDH	5'-TGAAGGTCGGTGTG AACGGATTTGGC-3'	5'-CATGTAGGCCATG AGGTCCACCAC-3'	Thermo Scientific

Por último, los fragmentos fueron separados en geles de agarosa-TBE (1X; dilución 1:5 de solución TBE 5X; composición: 54g de Trizma base, 27.5g de H₃BO₃, 4.2g de EDTA en 1L de agua mQ, pH 8.0) al 2% a un voltaje de 100 mV por 50 minutos. Se cuantificaron los productos separados del gel aplicando bromuro de etidio y se analizaron en el equipo miniBis Pro (Bio-imaging Systems) con una exposición negativa para la cuantificación de densitometría.

5. RESULTADOS.

5.1. Estandarización de la técnica de patch clamp en el registro de BMMCs.

Para comenzar este estudio fue necesario establecer parámetros basales con la técnica de patch clamp en la modalidad de fijación de voltaje para obtener registros electrofisiológicos reproducibles en BMMCs de ratón. Dos parámetros técnicos importantes que considerar en la técnica de fijación de voltaje en célula completa, son la resistencia de acceso y la fuga de corriente que puede generarse entre la pipeta de registro y la membrana celular. El proceso de desgranulación inducida por la activación del FcεRI en BMMCs puede desestabilizar el giga-sello generado entre la pipeta de registro y la membrana plasmática. Por esta razón, fue importante monitorear y establecer un límite de cambio en estos parámetros durante el registro como un requisito de inclusión en los resultados finales. Por lo tanto, se decidió que la fuga de corriente no fuera mayor a 20 pA y que la resistencia de acceso de la pipeta no variara más del 20% del valor inicial al momento de acceder al interior de la célula.

Nosotros registramos el PMR de BMMCs WT en solución extracelular estándar con y sin Na⁺ (Figura 8A), con el propósito de saber si la exclusión del Na⁺ externo influía en el PMR de estas

celulas, debido a que estudios anteriores sugieren que el PMR de las MC podría estar mantenido por iones Na^+ y Ca^{2+} , y no por K^+ (Bronner, Mousli, Eleno, & Landry, 1989). Los valores de PMR registrados en BMMCs dieron potenciales positivos (PMR sin Na^+ = $+45 \pm 4$ mV vs PMR con Na^+ = $+56.5 \pm 1.5$ mV), este es un dato atípico en células eucariontes. Sin embargo, un fenómeno similar fue observado en el estudio realizado por Bronner et al., (1989) en células cebadas del peritoneo de rata, las cuales presentaron una inmediata despolarización de la membrana cuando fueron puestas en una solución extracelular estándar. No obstante, este resultado requiere de mayor investigación para conocer si este fenómeno es real o no en MC. Por otra parte, nosotros observamos que la exclusión del sodio extracelular no afectó la amplitud de la corriente iónica en reposo de estas células (Figura 8B). Esto nos permitió utilizar de manera confiable una solución extracelular estándar sin Na^+ como estrategia experimental para registrar corrientes entrantes de Ca^{2+} aisladas en los próximos experimentos. Por otro lado, se registró la capacitancia membranal (C_m) en reposo de las BMMCs, la cual fue de 7.4 ± 0.6 pF; $n = 17$, congruente con la C_m reportada por Manfred Lindau & Fernandez, (1986) en células cebadas del peritoneo de rata. La C_m aumentó en respuesta a la estimulación con antígeno a diferentes concentraciones (Figura 8C; basal = 8.7 ± 0.8 pF vs DNP-HSA 1 ng/ml (6 min) = 9.6 ± 0.9 pF; $n = 8$, y basal = 7.1 ± 0.7 pF vs DNP-HSA 10 ng/ml (6 min) = 8.6 ± 0.6 pF; $n = 9$). Por otra parte, el antígeno a concentraciones de 1 y 10 ng/ml indujo un aumento en la densidad de la corriente en BMMCs (Figura 8D; basal = -5.0 ± 0.9 pA/pF vs DNP-HSA 1 ng/ml (6 min) = -6.0 ± 0.6 pA/pF; $n = 7$, y basal = -4.3 ± 0.4 pA/pF vs DNP-HSA 10 ng/ml (6 min) = -10.7 ± 2.0 pA/pF; $n = 8$). Por lo tanto, la estimulación con el antígeno DNP-HSA en BMMCs en la técnica de patch clamp funciona en las condiciones utilizadas.

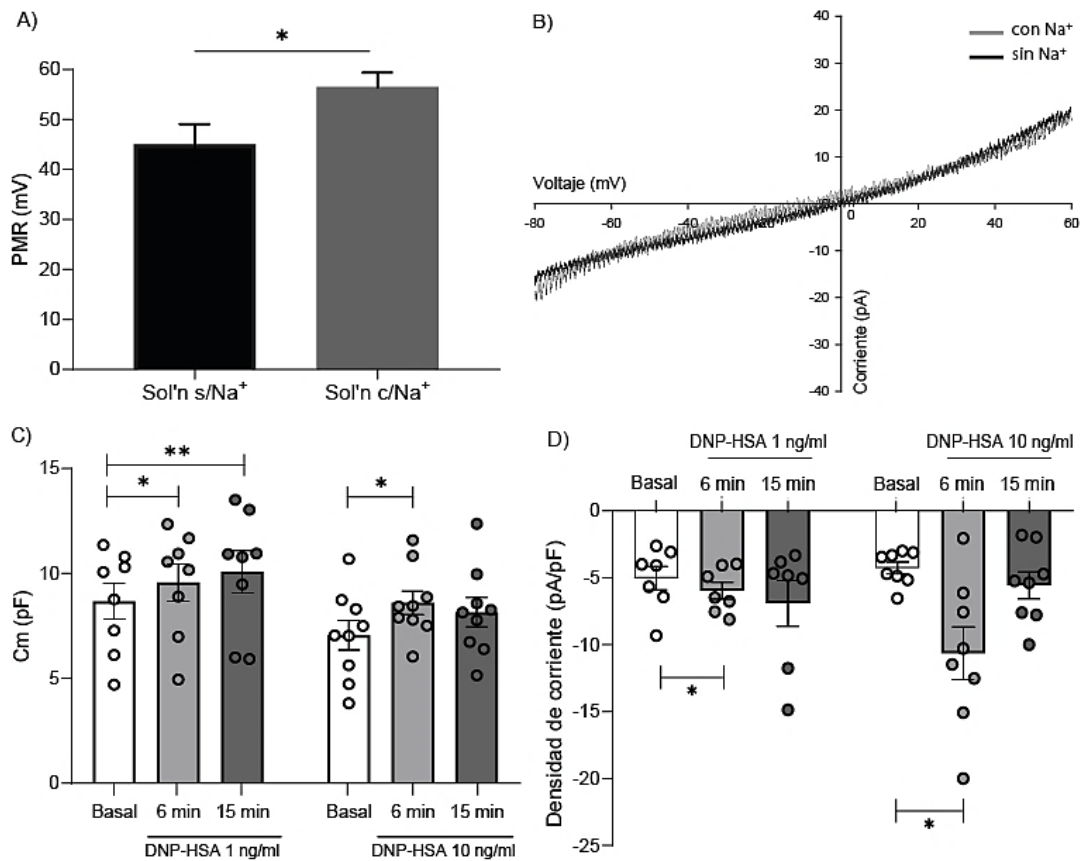


Figura 8. Propiedades pasivas de las BMMCs. Se utilizaron BMMCs previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml) por 24 horas antes de los registros electrofisiológicos. A) Registro del potencial de membrana en reposo (PMR) de las BMMCs en una solución extracelular sin sodio (sustituido por 120 mM N-metil-D-Glucamina) y con sodio 140 mM. B) Se muestra la gráfica de la relación V-I en estado basal de una BMMC en presencia y ausencia de sodio, utilizando un protocolo de rampa de voltaje desde -80 mV hasta +60 mV, desde un potencial fijo de 0 mV. C) La capacitancia membranal (C_m) de BMMCs perfundidas con una solución extracelular libre de Na^+ (basal) seguido de la perfusión de DNP-HSA 1 ng/ml o 10 ng/ml (antígeno) en la misma solución. Se registro la capacitancia membranal y D) la amplitud de la corriente a -80 mV de las BMMCs 6 minutos y 15 minutos a 23°C después de haber iniciado la estimulación con DNP-HSA 1 ng/ml o 10 ng/ml. Con estos datos se obtuvieron las densidades de corriente. Se muestran gráficas de barras (media \pm S.E.M. y los datos individuales) A) Análisis de U de Mann-Whitney, $n = 10$ ($*p < 0.05$). C) Análisis de ANOVA una vía de MR, $n = 9$ ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, prueba de Tukey). D) Análisis de ANOVA una vía de MR, $n = 8$ ($*p < 0.05$, prueba de Tukey).

5.2. La estimulación de baja y alta intensidad con antígeno induce un aumento en la amplitud de las corrientes de calcio en BMMCs.

Si bien, estudios previos han demostrado diferencias en los patrones de respuesta celular dependientes de la concentración de antígeno en células cebadas (Gonzalez-Espinosa et al., 2003) y sabiendo que el calcio es un segundo mensajero que podría estar orquestando éstas

diferencias a nivel molecular, decidimos realizar registros electrofisiológicos de la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs, para determinar si concentraciones crecientes de antígeno modulan la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$.

Una estimulación de baja intensidad con antígeno (DNP-HSA 1 ng/ml) induce un aumento máximo promedio del $69.7\% \pm 10.5\%$ ($n = 6$; *Anova una vía de MR*) en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ con respecto a la corriente basal (Figura 9A y 2B). De manera interesante, el aumento en la corriente de Ca^{2+} se mantiene cerca de su nivel máximo en función del tiempo (Figura 9A). La magnitud del aumento en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ puede observarse por los trazos de las corrientes registradas 6 y 15 min después de haber iniciado el estímulo con antígeno 1 ng/ml (Figura 9C).

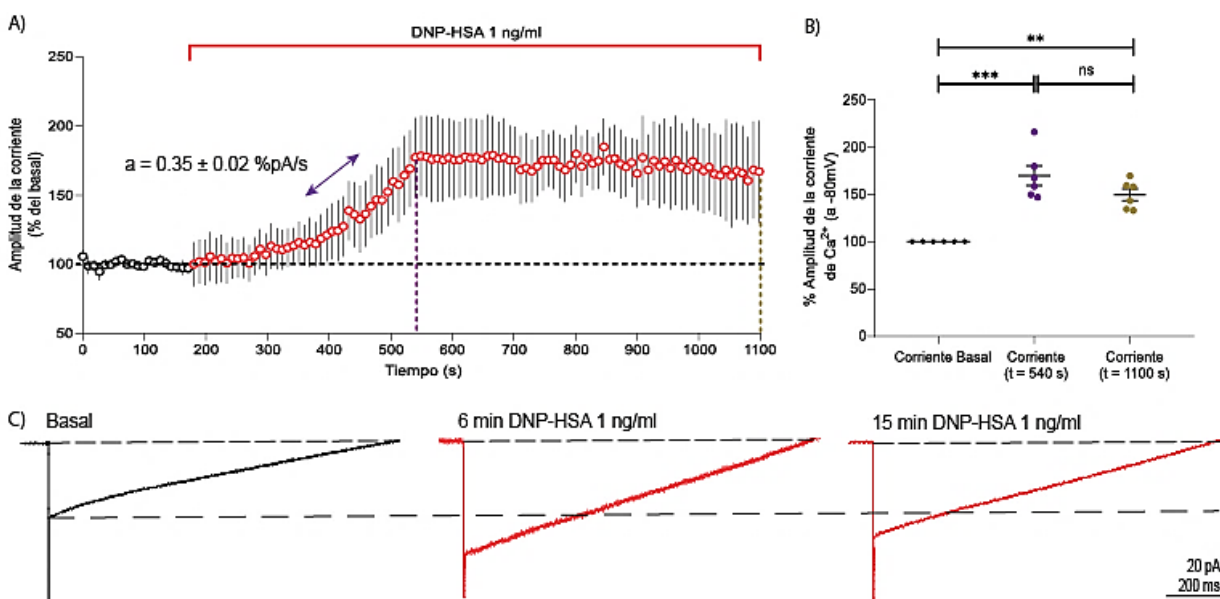


Figura 9. El estímulo de baja intensidad con antígeno induce un aumento de la $I_{Ca^{2+}}$ entrante sostenido en BMMCs. Se utilizaron BMMCs previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml). A) se obtuvieron registros de corriente en condiciones basales durante 3 min (círculos negros), posteriormente se perfundieron con DNP-HSA 1 ng/ml y se obtuvieron registros de corriente durante 15 min (círculos rojos). B) Se observa el porcentaje de aumento de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada a los 6 min después de haber iniciado la estimulación con DNP-HSA 1 ng/ml (círculos morados) y el porcentaje de aumento de la amplitud de la corriente de calcio registrada a los 15 min después de haber iniciado la estimulación (círculos cafés) con respecto al basal (100%). C) Se muestran los trazos de corriente registrados de un experimento representativo de una BMMC, en el cual, la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por DNP-HSA 1 ng/ml tras 6 min y 15 min de estimulación (trazos rojos) tienen una mayor amplitud con respecto a la amplitud de la corriente entrante de Ca^{2+} basal (trazo negro). A) Gráfica del porcentaje de la amplitud de la corriente entrante de Ca^{2+} a -80 mV en un tiempo total de 18 minutos (media \pm S.E.M.). Se realizó regresión lineal de la fase lineal de ascenso del porcentaje de la amplitud de la corriente comprendida desde los 380 s a los 540 s ($r^2 = 0.9610$; pendiente (a) = 0.35 ± 0.02 %pA/s). B) Gráfica de los datos del porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ basal, 6 min y 15 min de estimulación con DNP-HSA 1 ng/ml (media \pm S.E.M. y datos individuales). Análisis de ANOVA una vía de MR, $n = 6$ (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, prueba de Tukey).

De la misma manera, se realizaron experimentos en BMMCs previamente sensibilizadas utilizando una concentración de 10 ng/ml de antígeno. La estimulación con antígeno indujo un aumento en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ de $346\% \pm 63.9\%$ ($n = 7$; *Anova una vía de MR*) con respecto a la corriente basal registrada (Figura 10A y B). El incremento en la $I_{Ca^{2+}}$ disminuyó lentamente en presencia del estímulo hasta un $125\% \pm 23.5\%$ ($n = 7$; *Anova una vía de MR*) con respecto a la corriente basal. La cinética de la corriente en presencia de antígeno se muestra en la figura 10C.

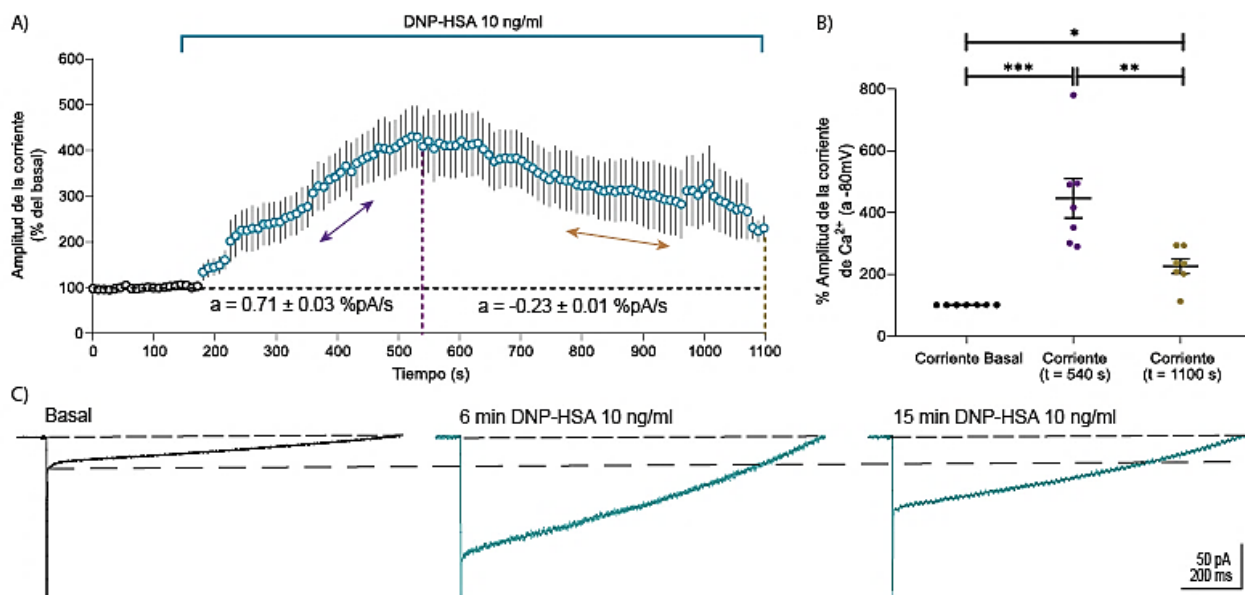


Figura 10. El estímulo de alta intensidad con antígeno induce un aumento de la $I_{Ca^{2+}}$ de gran magnitud en BMMCs. Se utilizaron BMMCs previamente sensibilizadas con IgE (100ng/ml). A) se obtuvieron registros de corriente en condiciones basales durante 3 min (círculos negros), posteriormente se perfundieron con DNP-HSA 10 ng/ml y se obtuvieron registros de corriente durante 15 min (círculos azules). B) Se observa el porcentaje de aumento de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada a los 6 min después de haber iniciado la estimulación con DNP-HSA 10 ng/ml (círculos morados) y el porcentaje de aumento de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada a los 15 min después de haber iniciado la estimulación (círculos cafés) con respecto al basal (100%). C) Se muestran los trazos de corriente registrados de un experimento representativo de una BMMC, en el cual, las corrientes de Ca^{2+} inducidas por DNP-HSA 10 ng/ml tras 6 min y 15 min de estimulación (trazos azules) tienen una mayor amplitud con respecto a la amplitud de la corriente entrante basal (trazo negro). A) Gráfica del porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ a -80 mV en un tiempo total de 18 minutos de experimento (media \pm S.E.M). Se realizó regresión lineal de la fase lineal de ascenso del porcentaje de la amplitud de la corriente comprendida desde los 380 s a los 540 s ($r^2 = 0.9713$; pendiente (a) = 0.71 ± 0.03 %pA/s), al igual que de la fase lineal de descenso comprendida desde los 760 s a los 960 s ($r^2 = 0.9385$; pendiente (a) = -0.23 ± 0.01 %pA/s). B) Gráfica de los datos del porcentaje de la amplitud de la corriente de Ca^{2+} basal, 6 min y 15 min de estimulación con DNP-HSA 10 ng/ml (media \pm S.E.M. y datos individuales). Análisis de ANOVA una vía de MR, $n = 7$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, prueba de Student Newman-Keuls).

Por lo tanto, el estímulo de alta intensidad (DNP-HSA 10 ng/ml) indujo un aumento máximo en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ mayor en comparación al aumento máximo inducido por el estímulo de baja intensidad (DNP-HSA 1 ng/ml). Las pendientes de ascenso de aumento de la corriente, comprendidas desde el tiempo de 360 s a 540 s en las gráficas obtenidas (Figuras 9A y 10A), son diferentes entre sí. La pendiente calculada en la fase lineal de ascenso del porcentaje de amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs estimuladas con 10 ng/ml de antígeno fue aproximadamente dos veces mayor ($a = 0.71 \pm 0.03$ %pA/s) en comparación a la pendiente calculada en la fase lineal de ascenso del porcentaje de amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs estimuladas con 1 ng/ml de antígeno ($a = 0.35 \pm 0.02$ %pA/s). Las pendientes se calcularon con el propósito de estimar la velocidad a la que el aumento de la $I_{Ca^{2+}}$ alcanza su nivel máximo en ambas concentraciones de antígeno en BMMCs.

Por otro lado, se realizaron registros con Ba^{2+} en sustitución del Ca^{2+} extracelular para corroborar que la corriente registrada está mediada por un canal de Ca^{2+} . Se sabe que canales de calcio, como los CCTL conducen una corriente mayor de Ba^{2+} que de Ca^{2+} , lo que incrementa la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ y, prolonga la inactivación dependiente de Ca^{2+} de estos canales (Hofmann, Flockerzi, Kahl, & Wegener, 2014).

En presencia de Ba^{2+} , la estimulación con 1 ng/ml de antígeno aumentó en un 188.2% ($n = 4$; *Anova una vía de MR*) con respecto a la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ (Figura 11A y B). Sin embargo, esta corriente regresa a su nivel basal. Los trazos de las corrientes de Ca^{2+} y Ba^{2+} a los 3 y 6 min de estimulación con antígeno, se muestran en la Figura 11C.

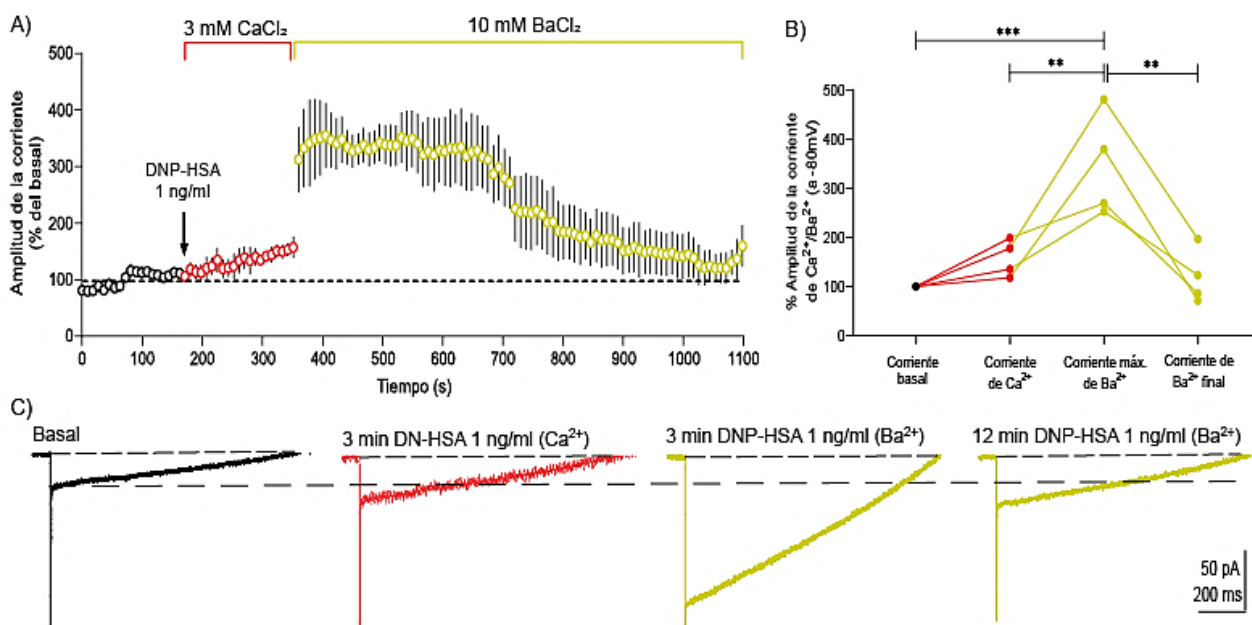


Figura 11. El Ba^{2+} induce un aumento en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por un estímulo de baja intensidad con DNP-HSA. Se utilizaron BMMCs previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml). A) se

obtuvieron registros de corriente en condición basal durante 3 min (círculos negros), posteriormente se perfundieron con DNP-HSA 1 ng/ml y se obtuvieron registros de corriente durante 3 min (círculos rojos) y, por último, se perfundieron con una solución con DNP-HSA 1 ng/ml, 10 mM de BaCl₂ libre de Ca²⁺ y se obtuvieron registros de las corrientes durante 12 minutos (círculos amarillos). B) Se observa el porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal de BMMCs, considerado como el 100% (círculos negros), el porcentaje de la amplitud de la I_{Ca²⁺} registrada 3 min después de haber iniciado la estimulación con DNP-HSA 1 ng/ml (círculos rojos) y el porcentaje de la amplitud de la I_{Ba²⁺} registrada a los 3 y 12 min después de la perfusión de DNP-HSA 1 ng/ml en solución de 10 mM de BaCl₂ (círculos amarillos). C) Se muestran los trazos de corriente registrados de un experimento representativo de una BMMC, en el cual, las corrientes entrantes de Ca²⁺ inducidas por DNP-HSA 1 ng/ml 3 min de estimulación (trazo rojo) tiene una mayor amplitud con respecto a la amplitud de la corriente entrante basal (trazo negro). La amplitud de la I_{Ca²⁺} aumenta considerablemente en presencia de Ba²⁺ 10 mM (trazos amarillos). A) Gráfica del porcentaje de la amplitud de la corriente de Ca²⁺ y Ba²⁺ a -80 mV en un tiempo total de 18 minutos (media ± S.E.M.). B) Gráfica de los datos del porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal, 3 min de estimulación con 1 ng/ml de DNP-HSA en solución extracelular con 3 mM de CaCl₂ y 12 min con 1 ng/ml de DNP-HSA en solución extracelular con 10 mM de BaCl₂ (media ± S.E.M. y datos individuales). Análisis de ANOVA una vía de MR, n = 4 (**p<0.01, ***p<0.001, prueba de Tukey).

De manera similar a lo observado con un estímulo de baja intensidad, la amplitud de la I_{Ba²⁺} aumentó 140.4% (n = 3; Anova una vía de MR) con respecto a la amplitud de la I_{Ca²⁺} máxima, inducida con 10 ng/ml de antígeno (Figura 12A y B). Como se aprecia en la figura 12A, la I_{Ba²⁺} disminuye rápidamente hasta regresar al nivel basal. Los trazos de las corrientes de Ca²⁺ y Ba²⁺ después de 3 y 6 min se muestran en la figura 12C. Estos datos demuestran que la estimulación con antígeno genera una corriente dependiente de canales de calcio vía IgE/FcεRI en BMMCs y sugiere, que la estimulación antigénica en BMMCs requiere de una entrada de Ca²⁺.

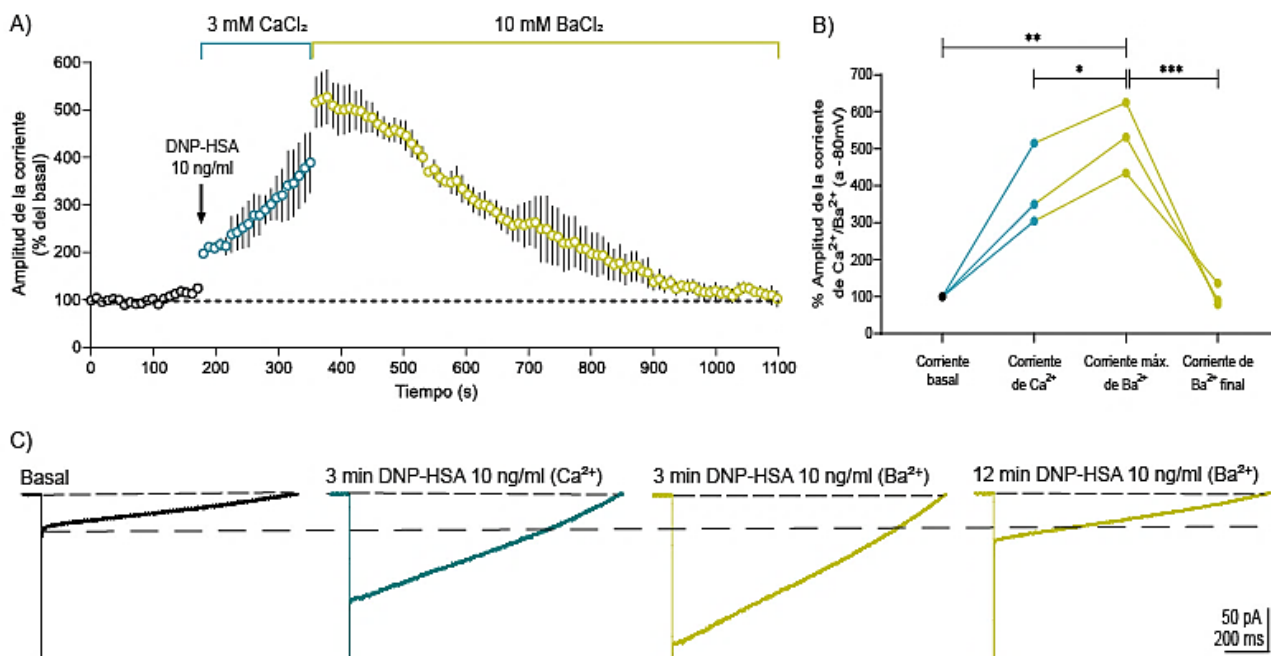


Figura 12. El Ba^{2+} induce un aumento en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por un estímulo de alta intensidad con DNP-HSA. Se utilizaron BMMCs previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml). A) Se obtuvieron registros de corriente en condiciones basales durante 3 min (círculos negros), posteriormente se perfundieron con 10 ng/ml de DNP-HSA en la misma solución extracelular y se obtuvieron registros de corriente durante 3 min (círculos azules) y, por último, se perfundieron con una solución con DNP-HSA 10 ng/ml, 10 mM de $BaCl_2$ y libre de Ca^{2+} y se obtuvieron registros de las corrientes por 12 minutos (círculos amarillos). B) Se observa el porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal de BMMCs, considerado como el 100% (círculos negros), el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada 3 min después de haber iniciado la estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA (círculos azules) y el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ba^{2+}}$ registrada 3 min después de la perfusión de 10 ng/ml de DNP-HSA en solución de 10 mM de $BaCl_2$ y 12 min después (círculos amarillos). C) Se muestran los trazos de corriente registrados de un experimento representativo de una BMMC, en el cual, la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por 10 ng/ml de DNP-HSA 3 min de estimulación (trazo azul) tiene una mayor amplitud con respecto a la amplitud de la corriente entrante basal (trazo negro). La amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ aumenta considerablemente en presencia de Ba^{2+} 10 mM (trazos amarillos). A) Gráfica del porcentaje de la amplitud de la corriente de Ca^{2+} y Ba^{2+} a -80 mV en un tiempo total de 18 minutos (media \pm S.E.M.). B) Gráfica de los datos del porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal, 3 min de estimulación con DNP-HSA 10 ng/ml en solución extracelular con 3 mM de $CaCl_2$ y 12 min con 10 ng/ml de DNP-HSA en solución extracelular con 10 mM de $BaCl_2$ (media \pm S.E.M. y datos individuales). Análisis de ANOVA una vía de MR, $n = 3$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, prueba de Student-Newman-Keuls).

5.3. Las corrientes de Ca^{2+} máximas inducidas por la estimulación de baja y alta intensidad con antígeno son sensibles a nifedipina.

Los resultados obtenidos hasta este momento demostraban que la estimulación con ambas concentraciones de antígeno (1 y 10 ng/ml) inducen un aumento de la $I_{Ca^{2+}}$ que puede estar mediado por la apertura de varios canales de calcio localizados en la membrana plasmática. El siguiente experimento tuvo como finalidad demostrar si la $I_{Ca^{2+}}$ está mediada por un CCTL. Para esto se utilizó el bloqueador selectivo de los CCTL, la nifedipina (10 μ M).

La figura 13 muestra que la perfusión de nifedipina revierte el incremento en la $I_{Ca^{2+}}$ generado por 1 ng/ml de antígeno. La nifedipina bloquea el 89.5% ($n = 6$; Anova una vía de MR) (Figura 13B) del efecto generado por 1 ng/ml de antígeno. Los efectos de la nifedipina sobre la $I_{Ca^{2+}}$ se resumen en la figura 13C.

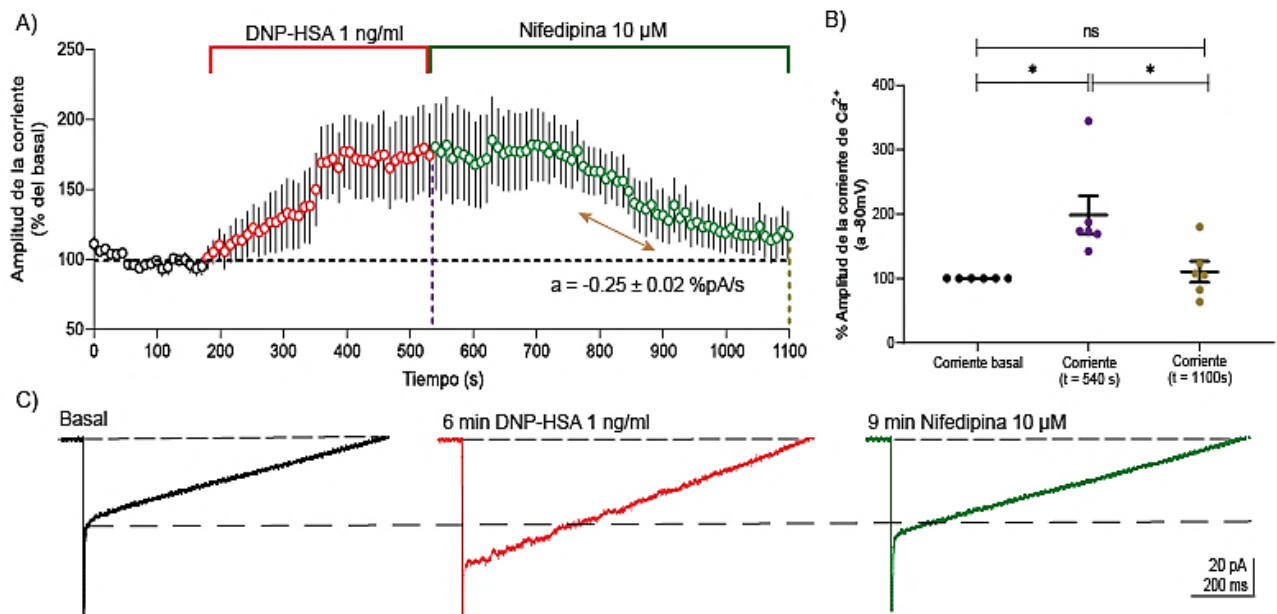


Figura 13. La amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ máxima inducida por DNP-HSA 1 ng/ml presenta una disminución lenta en presencia de nifedipina. Se utilizaron BMMCs previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml). A) Se obtuvieron registros de corriente en condiciones basales durante 3 min (círculos negros), posteriormente se perfundieron con 1 ng/ml de DNP-HSA y se obtuvieron registros de corriente durante 6 min (círculos rojos) y, por último, se perfundieron con una solución que contenía nifedipina 10 μ M y 1 ng/ml de DNP-HSA y se obtuvieron registros de las corrientes por 9 minutos (círculos verdes). B) Se observa el porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal de BMMCs, considerado como el 100% (círculos negros), el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada a los 6 min después de haber iniciado la estimulación con 1 ng/ml de DNP-HSA (círculos morados) y el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada a los 9 min después de la perfusión de nifedipina 10 μ M (círculos cafés). C) Se muestran los trazos de corriente registrados de un experimento representativo de una BMMC, en el cual, las corrientes de Ca^{2+} inducidas por 1 ng/ml de DNP-HSA 6 min de estimulación (trazo rojo) tiene una mayor amplitud con respecto a la amplitud de la corriente entrante basal (trazo negro). La amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ máxima disminuye considerablemente en presencia de Nifedipina 10 μ M (trazo verde). A) Gráfica del porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ a -80 mV en un tiempo total de 18 minutos (media \pm S.E.M). Se realizó regresión lineal de la fase lineal de descenso del porcentaje de la amplitud de la corriente comprendida desde los 760 s a los 960 s ($r^2 = 0.9148$; pendiente (a) = -0.25 ± 0.02 %pA/s). B) Gráfica de los datos del porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal, 6 min de estimulación con 1 ng/ml de DNP-HSA y 9 min con Nifedipina 10 μ M (media \pm S.E.M. y datos individuales). Análisis de ANOVA una vía de MR, $n = 6$ (* $p < 0.05$, prueba de Holm-Sidak).

Este mismo experimento se replicó para la concentración de 10 ng/ml de antígeno. Como se observa en la figura 14A y B, la $I_{Ca^{2+}}$ es sensible a nifedipina en 95.0% ($n = 6$; Anova una vía de MR). Los trazos representativos mostrando este efecto se encuentran en la figura 14C.

Para estimar la velocidad con la que la nifedipina bloquea la corriente de Ca^{2+} inducida por DNP-HSA 10 ng/ml se calculó la pendiente de la fase lineal de descenso del curso temporal de la figura

14A. Dicha pendiente tuvo un valor de -0.27 ± 0.01 %pA/s, muy similar a la pendiente calculada de la fase lineal de descenso de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por 1 ng/ml de DNP-HSA en presencia de nifedipina (Figura 13A; $a = -0.25 \pm 0.02$ %pA/s).

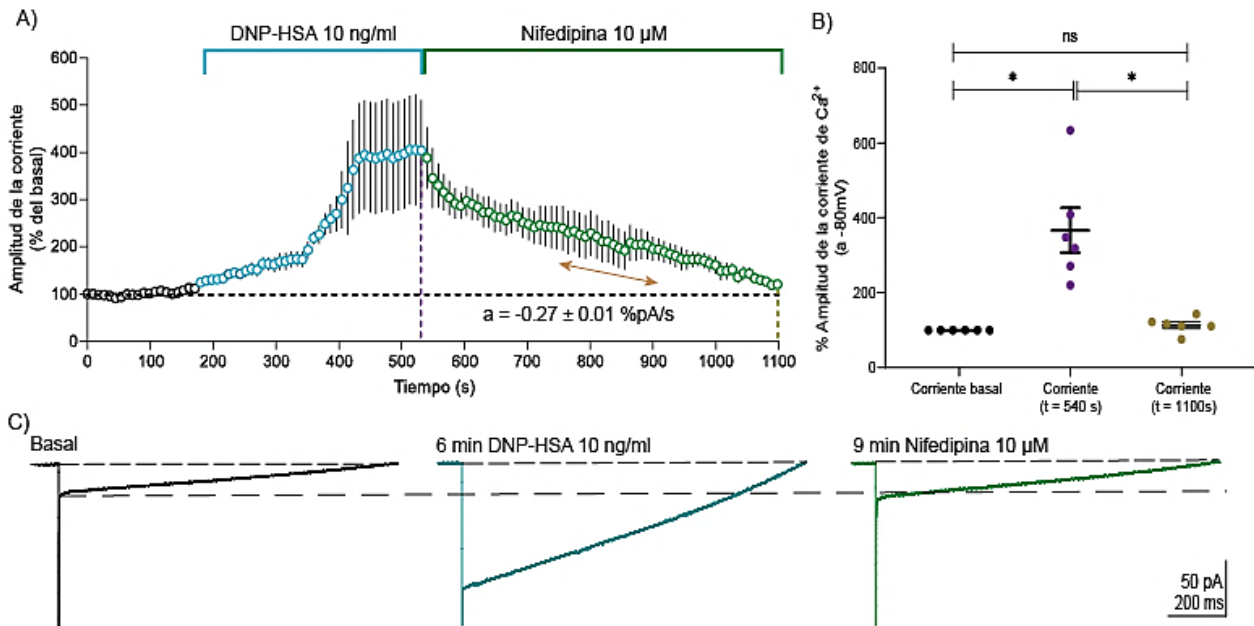


Figura 14. La amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ máxima inducida por DNP-HSA 10 ng/ml presenta una alta sensibilidad a nifedipina. Se utilizaron BMMCs previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml). A) se obtuvieron registros de corriente en condiciones basales durante 3 min (círculos negros), posteriormente se perfundieron con 10 ng/ml de DNP-HSA y, se obtuvieron registros de corriente durante 6 min (círculos azules) y, por último, se perfundieron con una solución que contenía nifedipina 10 μ M y 10 ng/ml de DNP-HSA y se obtuvieron registros de las corrientes por 9 minutos (círculos verdes). B) Se observa el porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal de BMMCs, considerado como el 100% (círculos negros), el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada 6 min después de haber iniciado la estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA (círculos morados) y el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada 9 min después de la perfusión de nifedipina 10 μ M (círculos cafés). C) Se muestran los trazos de corriente registrados de un experimento representativo de una BMMC, en el cual, las corrientes de Ca^{2+} inducidas por 10 ng/ml de DNP-HSA 6 min de estimulación (trazo azul) tiene una mayor amplitud con respecto a la amplitud de la corriente entrante basal (trazo negro). La amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ máxima disminuye considerablemente en presencia de nifedipina 10 μ M (trazo verde). A) Gráfica del porcentaje de la amplitud de la corriente entrante de Ca^{2+} a -80 mV en un tiempo total de 18 minutos (media \pm S.E.M). Se realizó regresión lineal de la fase lineal de descenso del porcentaje de la amplitud de la corriente comprendida desde los 760 s a los 960 s ($r^2 = 0.9460$; pendiente (a) = -0.27 ± 0.01 %pA/s). B) Gráfica de los datos del porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal, 6 min de estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA y 9 min con nifedipina 10 μ M (media \pm S.E.M. y datos individuales). Análisis de ANOVA una vía de MR, $n = 6$ (* $p < 0.05$; prueba de Tukey).

En conjunto, estos resultados demostraron que la estimulación antigénica vía IgE/FcεRI en BMMCs genera una $I_{Ca^{2+}}$ sensible a nifedipina. Además, estos resultados sugieren una activación diferencial de los CCTL en función de la concentración de antígeno utilizado.

5.4. La cinasa Lyn es importante para la inducción de la corriente de Ca^{2+} en respuesta a la estimulación antigénica de baja y alta intensidad en BMMCs.

Los siguientes experimentos tuvieron como finalidad determinar si la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por antígeno vía IgE/FcεRI y sensible a nifedipina depende de las cinasas de la familia Src. Se obtuvieron registros en BMMCs $Lyn^{-/-}$ y en BMMCs $Fyn^{-/-}$ estimulando con 1 y 10 ng/ml de antígeno. La figura 15A y B muestran registros de BMMCs $Lyn^{-/-}$ en presencia de 1 ng/ml de DNP-HSA. En estas condiciones, el DNP-HSA no induce una $I_{Ca^{2+}}$. Los trazos de las corrientes de Ca^{2+} muestran el papel crítico de la cinasa Lyn para generar esta corriente (Figura 15C).

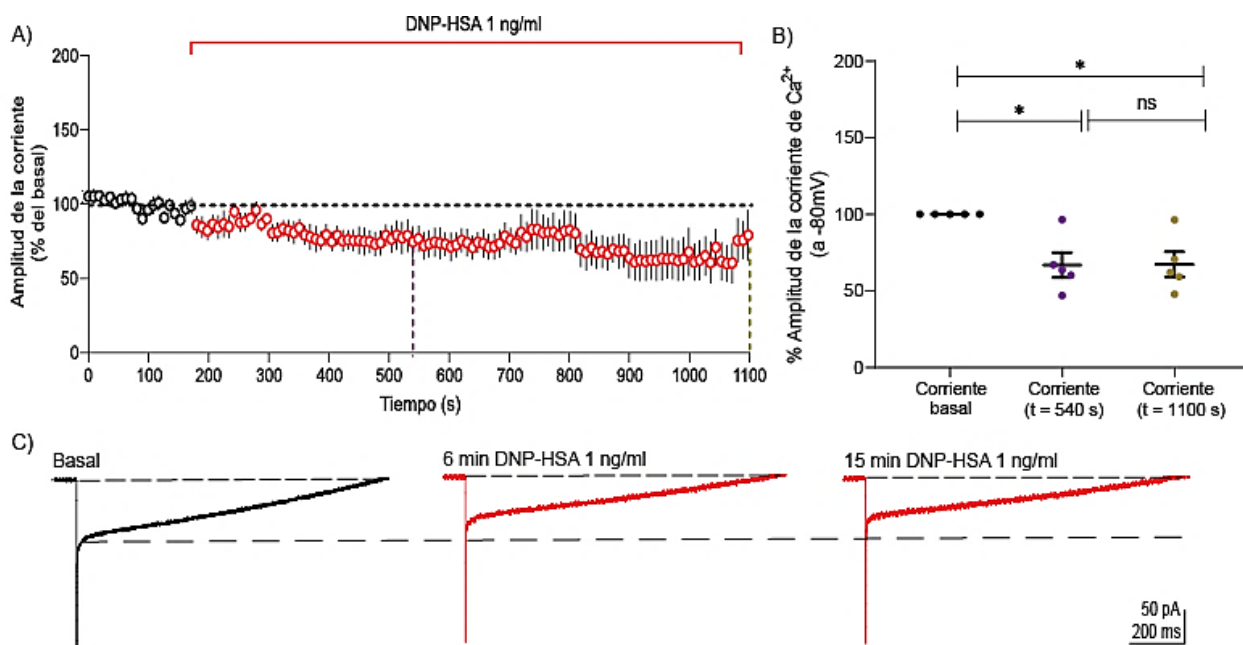


Figura 15. El estímulo de baja intensidad dado por DNP-HSA 1 ng/ml no induce un incremento en la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs $Lyn^{-/-}$. Se utilizaron BMMCs $Lyn^{-/-}$ previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml). A) Se obtuvieron registros de corriente en condiciones basales durante 3 min (círculos negros), posteriormente se perfundieron con 1 ng/ml de DNP-HSA en la misma solución extracelular y se obtuvieron registros de corriente durante 15 min (círculos rojos). B) Se observa el porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal de BMMCs, considerado como el 100% (círculos negros), el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada 6 min después de haber iniciado la estimulación con 1 ng/ml de DNP-HSA (círculos morados) y el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada 15 min después de haber iniciado la estimulación con 1 ng/ml de DNP-HSA (círculos cafés). C) Se muestran los trazos de corriente registrados de un experimento representativo de una BMMC, en el cual, se observa que no hay aumento en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ tras 6 y 15 minutos de estimulación con 1 ng/ml de DNP-HSA (trazos rojos). A) Gráfica del porcentaje de la amplitud

de la $I_{Ca^{2+}}$ a -80 mV en un tiempo total de 18 minutos (media \pm S.E.M.). B) Gráfica de los datos del porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal, 6 y 15 min de estimulación con 1 ng/ml de DNP-HSA (media \pm S.E.M. y datos individuales). Análisis de ANOVA una vía de MR, $n = 5$ ($*p < 0.05$; prueba de Tukey).

De manera similar, la estimulación con 10 ng/ml de antígeno no incrementa la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs $Lyn^{-/-}$ (Figura 16A y B). Los trazos representativos de BMMCs $Lyn^{-/-}$ en presencia de 10 ng/ml de antígeno se muestran en la figura 16C.

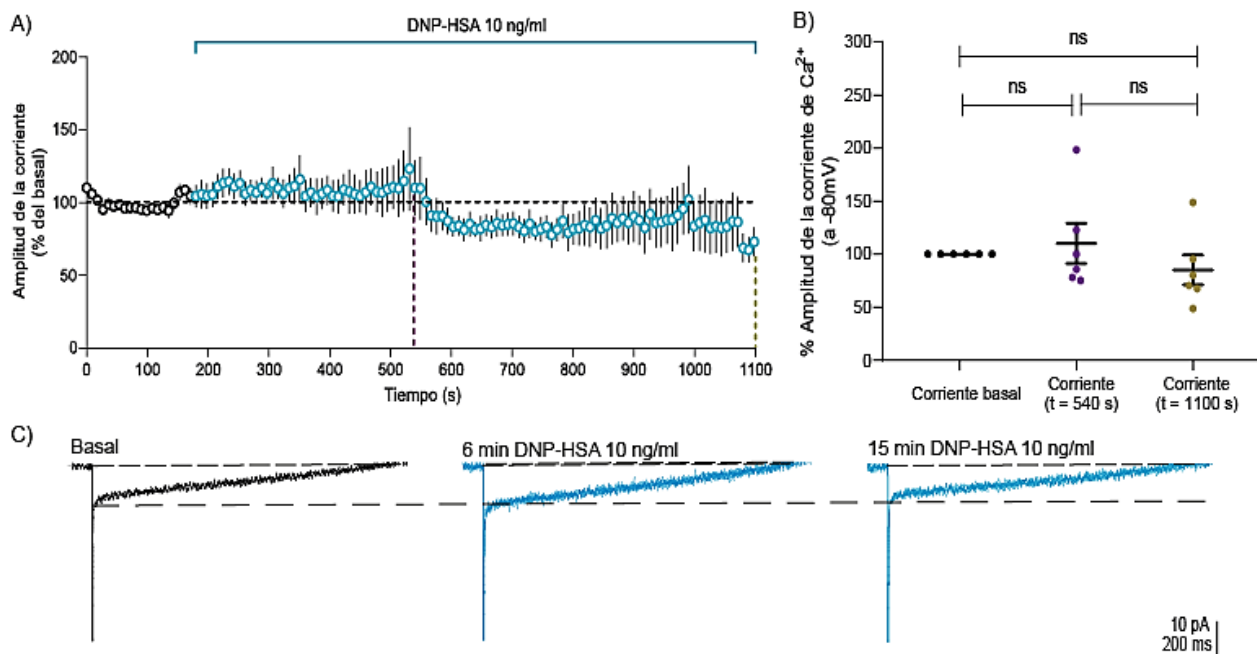


Figura 16. El estímulo de alta intensidad dado por DNP-HSA 10 ng/ml no induce un aumento en la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs $Lyn^{-/-}$. Se utilizaron BMMCs $Lyn^{-/-}$ previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml). A) Se obtuvieron registros de corriente en condiciones basales durante 3 min (círculos negros), posteriormente se perfundieron con 10 ng/ml de DNP-HSA en la misma solución extracelular y se obtuvieron registros de corriente durante 15 min (círculos azules). B) Se observa el porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal de BMMCs $Lyn^{-/-}$, considerado como el 100% (círculos negros), el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada 6 min después de haber iniciado la estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA (círculos morados) y el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada 15 min después de haber iniciado la estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA (círculos cafés). C) Se muestran los trazos de corriente registrados de un experimento representativo de una BMMC, en el cual, se observa que no hay aumento en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ tras 6 y 15 minutos de estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA (trazos azules). A) Gráfica del porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ a -80 mV en un tiempo total de 18 minutos (media \pm S.E.M.). B) Gráfica de los datos del porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal, 6 y 15 min de estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA (media \pm S.E.M. y datos individuales). Análisis de ANOVA una vía de MR, $n = 6$ (ns; prueba de Tukey).

Posteriormente, evaluamos el efecto de la estimulación con 10 ng/ml de antígeno en el aumento de la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs $Fyn^{-/-}$. Los resultados hasta el momento demuestran que la estimulación con

10 ng/ml de antígeno induce un incremento en la amplitud de la corriente de calcio en estas células (Figura 17A y B). La amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por una estimulación de alta intensidad con antígeno en estas células es similar en comparación a la registrada en BMMCs WT (Figura 17A y 10A). Aunque, esta comparación no es concluyente, ya que el número de experimentos realizados en BMMCs $Fyn^{-/-}$ es bajo.

Estos resultados sugieren que la activación de la cinasa Lyn es un paso crítico en la señalización del receptor $Fc\epsilon RI$ en BMMCs, y participa de manera central en la generación de la $I_{Ca^{2+}}$ sensible a nifedipina. Sin embargo, estos resultados no excluyen la posible participación de la cinasa Fyn, sin embargo, se requieren más experimentos para descartar o confirmar esta hipótesis.

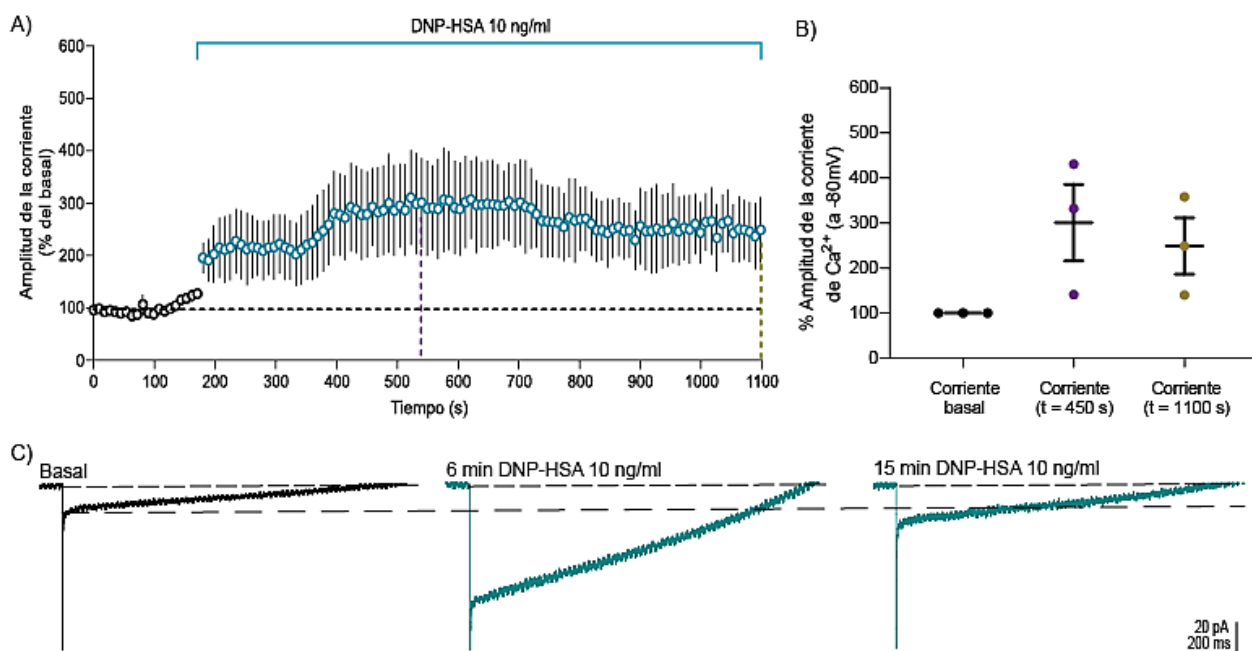


Figura 17. El estímulo de alta intensidad dado por DNP-HSA 10 ng/ml induce un incremento en la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs $Fyn^{-/-}$. Se utilizaron BMMCs $Fyn^{-/-}$ previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml). A) Se obtuvieron registros de corriente en condiciones basales durante 3 min (círculos negros), posteriormente se perfundieron con 10 ng/ml de DNP-HSA en la misma solución extracelular y se obtuvieron registros de corriente durante 15 min (círculos azules). B) Se observa el porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal de BMMCs $Fyn^{-/-}$, considerado como el 100% (círculos negros), el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada 6 min después de haber iniciado la estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA (círculos morados) y el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ registrada 15 min después de haber iniciado la estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA (círculos cafés). C) Se muestran los trazos de corriente registrados de un experimento representativo de una BMMC $Fyn^{-/-}$, en el cual, las corrientes de Ca^{2+} inducidas por 10 ng/ml de DNP-HSA con 6 y 15 min de estimulación (trazos azules). A) Gráfica del porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ a -80 mV en un tiempo total de 18 minutos (media \pm S.E.M.). B) Gráfica de los datos del porcentaje de la amplitud de la corriente entrante basal, 6 y 15 min de estimulación con 10 ng/ml de DNP-HSA (media \pm S.E.M. y datos individuales).

5.5. La entrada de Ca²⁺ a través de CCTL es necesario para la acumulación del ARNm de citocinas en BMMCs.

Por último, nos preguntamos si el calcio que entra a través de CCTL inducido por una baja y alta intensidad de estímulo con antígeno es importante para la acumulación del ARNm de las citocinas CCL2, IL-3 e IL-6 en BMMCs. Por lo tanto, se realizaron experimentos de RT-PCR en BMMCs WT previamente sensibilizadas con IgE (100 ng/ml). La acumulación del ARNm de la quimiocina CCL2 inducida por una concentración de 10 ng/ml de antígeno fue atenuada en presencia de nifedipina 10 µM (Figura 18A). Mientras que, la acumulación del ARNm de CCL2 inducida por una concentración de 1 ng/ml de antígeno no presentó una diferencia estadísticamente significativa cuando las BMMCs fueron pretratadas con nifedipina. Este resultado demuestra que el gen de CCL2 requiere, en parte, de una entrada de Ca²⁺ sensible a dihidropiridinas para su adecuada acumulación inducida por un estímulo de alta intensidad (10 ng/ml de DNP-HSA).

Por otra parte, la acumulación del ARNm de IL-6 inducido por ambas concentraciones de DNP-HSA no presentaron cambio alguno en presencia de Nifedipina 10 µM (Figura 18B). Por lo que, el gen de IL-6 parece no depender de un influjo de calcio sensible a dihidropiridinas en BMMCs activadas por antígeno vía receptor FcεRI, al menos por el tiempo estipulado de estimulación en este estudio.

Por último, la acumulación del ARNm de la IL-3 inducida con 1 ng/ml de DNP-HSA se exagera en BMMCs pretratadas con nifedipina 10 µM (Figura 18C). Mientras que, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre la acumulación del mensajero de IL-3 inducida con 10 ng/ml de antígeno en ausencia y en presencia de nifedipina 10 µM en BMMCs.

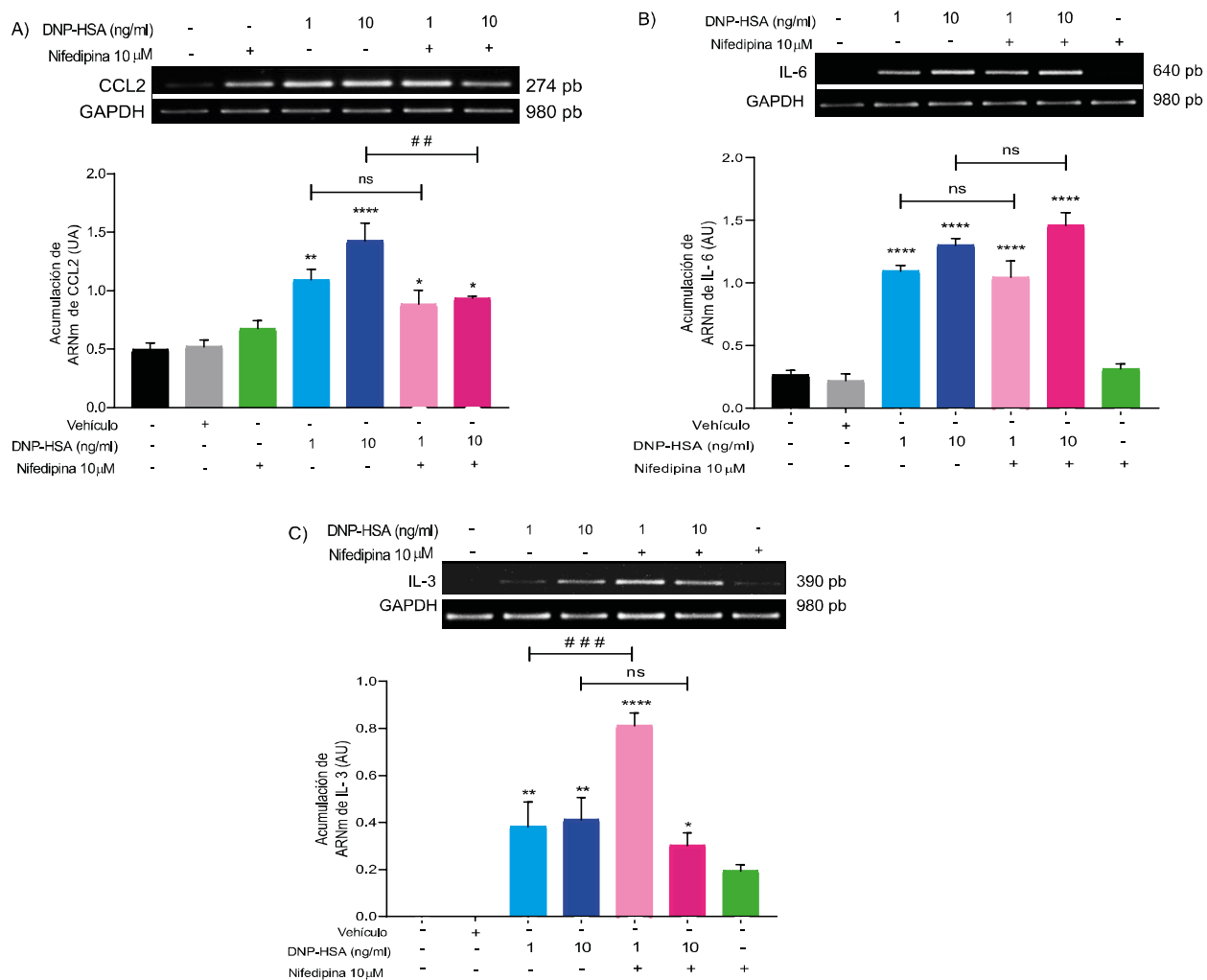


Figura 18. Efecto de la Nifedipina sobre la acumulación de ARNm de diferentes citocinas inducida por un estímulo antigénico de baja y alta intensidad con DNP-HSA. 2×10^6 de BMMCs WT (por condición) sensibilizadas con IgE (100 ng/ml) durante 24 horas antes de los experimentos fueron suspendidas en medio Tyrodes. Las BMMCs se pretrataron con Nifedipina 10 μ M durante 15 minutos, posteriormente fueron estimuladas con 1 ng/ml o 10 ng/ml de DNP-HSA durante 15 minutos y se extrajo el ARNm total. Se realizó RT-PCR para amplificar los genes de las citocinas A) CCL2, B) IL-6 e C) IL-3. Se muestran las gráficas de barras de 4 experimentos independientes (media \pm S.E.M.). Análisis de ANOVA una vía, $n = 4$. Los asteriscos denotan la significancia estadística en comparación con el control y los símbolos de gato entre grupos tratados. ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$; $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$, $\#\#\#p < 0.001$. prueba de Bonferroni).

6. DISCUSIÓN.

Los hallazgos obtenidos en este estudio son los siguientes: 1) La magnitud de la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por la activación del receptor FcεRI en BMMCs es dependiente de la concentración de antígeno. 2) La estimulación con antígeno en BMMCs induce una $I_{Ca^{2+}}$ sensible a nifedipina y dependiente de la concentración de antígeno utilizada para inducirlo. 3) Se requiere de la cinasa Lyn para generar la $I_{Ca^{2+}}$ tras la estimulación antigénica vía FcεRI en BMMCs. 4) El aumento en la acumulación del ARNm de CCL2 requiere, parcialmente, de una $I_{Ca^{2+}}$ sensible a nifedipina a través de CCTL en respuesta a una estimulación con 10 ng/ml de antígeno. Mientras que, la $I_{Ca^{2+}}$ sensible a nifedipina a través de CCTL contribuye en la disminución de la acumulación del ARNm de IL-3 en respuesta a una estimulación con 1 ng/ml de antígeno.

La sensibilidad de la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs a las concentraciones de antígeno demuestran una relación directamente proporcional, un fenómeno que había sido observado previamente (Suzuki, Yoshimaru, Inoue, & Ra, 2009b). Sin embargo, nuestro trabajo demuestra por primera vez, el efecto de un inactivador selectivo de CCTL (nifedipina) sobre la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por la activación del receptor FcεRI en BMMCs a diferentes intensidades de estímulo con antígeno.

Por otra parte, la velocidad de ascenso de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ en respuesta a las concentraciones de antígeno concuerdan con estudios previos. MacGlashan & Guo, (1991) y Suzuki *et al.*, (2009b), observaron que la pendiente de ascenso durante la acumulación máxima de Ca^{2+} intracelular es mayor conforme se estimula con concentraciones más altas de antígeno en MC de pulmón y BMMCs, respectivamente. Este resultado también indica el comportamiento que tendrían los canales de calcio durante su apertura: 1) en respuesta a 10 ng/ml de antígeno se podrían estar abriendo un mayor número de canales de calcio del mismo tipo a los que se abren en respuesta a 1 ng/ml de antígeno, lo que permite una conductancia de Ca^{2+} mayor por unidad de tiempo a través de la membrana plasmática o 2) que en respuesta a 10 ng/ml de antígeno se esté induciendo un mecanismo que promueva la apertura de CCTL más rápido en comparación al mecanismo que promueve la apertura de CCTL en respuesta a 1 ng/ml de antígeno. Por esta razón se podría estar generando una $I_{Ca^{2+}}$ de mayor magnitud en respuesta a 10 ng/ml de antígeno. Esto último tiene sentido, ya que se sabe que, los CCTL tienen una conductancia al calcio de canal unitario (9 pS) mayor que la conductancia de canales selectivos a calcio activados por la liberación de calcio de pozas intracelulares (CRAC) (0.02 pS) (Catterall et al., 2005; Parekh & Putney, 2005).

Los experimentos en presencia de 10 mM de Ba^{2+} libre de Ca^{2+} demostraron que las corrientes estimuladas con antígeno ocurren a través de un canal de Ca^{2+} . Nuestros resultados muestran que el porcentaje de la amplitud de la $I_{Ba^{2+}}$ es mayor al porcentaje de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ con ambas concentraciones de antígeno. Se sabe que, los CCTL tienen una mayor conductancia unitaria al Ba^{2+} (25 pS) que al Ca^{2+} (9 pS) (Catterall et al., 2005). Incluso los canales CRAC que

permiten la corriente SOCE también permean Ba^{2+} , pero su conductancia al Ba^{2+} no se ha determinado (Parekh & Putney, 2005). Además, los CCTL son más sensibles a un bloqueo por Ba^{2+} (aunque ésta es más lenta que el inducido por Ca^{2+}) (Catterall et al., 2005), que los canales CRAC, los cuales se ha observado que son altamente insensibles a un bloqueo por Ba^{2+} (Hoth & Penner, 1993). Por lo tanto, el incremento de la $I_{Ba^{2+}}$ inducido con ambas concentraciones de antígeno demuestra la apertura de canales de Ca^{2+} y el posterior bloqueo de esta corriente sugiere la participación de CCTL (sensibles al bloqueo por Ba^{2+}).

Previo a nuestro trabajo, se reportó que la nifedipina disminuye la acumulación intracelular de Ca^{2+} por estimulación antigénica vía IgE/FcεRI en BMMCs (Suzuki *et al.*, 2009a). Nuestro trabajo demostró directamente que la $I_{Ca^{2+}}$, estimulada por 1 y 10 ng/ml de antígeno está mediada por un canal sensible a nifedipina. Sin embargo, la sensibilidad de la $I_{Ca^{2+}}$ a nifedipina es diferente en temporalidad entre una concentración y otra de antígeno, lo que sugiere mecanismos de apertura del canal de calcio de tipo L diferentes y dependientes de la concentración de antígeno. Para el caso de la estimulación de alta intensidad (10 ng/ml) hipotetizamos la existencia de un mecanismo de apertura de los CCTL más rápido que el mecanismo de apertura de los CCTL en respuesta a una estimulación de alta intensidad (1 ng/ml). Este mecanismo de apertura de los CCTL podría estar mediado por una fosforilación de alguna cinasa activada en la cascada de transducción de señales del receptor FcεRI interactuando con las subunidades de los CCTL (Figura 19), una posibilidad que requiere mayor investigación.

Por otra parte, los mecanismos moleculares por los cuales la activación del receptor FcεRI están modulando la apertura de los CCTL en BMMCs se desconocen. Es ampliamente aceptado que la cinasa Lyn es activada en respuesta al entrecruzamiento de receptores FcεRI por estimulación antigénica y es el principal componente molecular para desencadenar la entrada de calcio operada por almacenes intracelulares (SOCE) vía PLCγ-PIP₂-IP₃ (Chelombitko, Fedorov, Ilyinskaya, Zinovkin, & Chernyak, 2016). Nuestros experimentos en BMMCs carentes de la cinasa Lyn (BMMCs Lyn^{-/-}) mostraron que, en esta condición, el antígeno no incrementa la $I_{Ca^{2+}}$. Estos resultados concuerdan con los datos reportados por Parravicini *et al.*, (2002), donde los autores observaron que BMMCs Lyn^{-/-} estimuladas con 30 ng/ml de DNP-HSA acumulan menos calcio citosólico.

Con respecto a la cinasa Fyn, nuestros resultados mostraron que la estimulación con 10 ng/ml de antígeno incrementa la $I_{Ca^{2+}}$ en BMMCs Fyn^{-/-} (que no expresan a la cinasa Fyn, pero si a la cinasa Lyn). Esta corriente llega a una amplitud máxima similar a la amplitud de la corriente máxima de Ca^{2+} inducida por la misma concentración de antígeno en BMMCs WT (que expresan a ambas cinasas). Este resultado concuerda con el estudio realizado por Sanchez-Miranda *et al.*, (2010), que demostró en BMMCs Fyn^{-/-} un menor aumento de la concentración de calcio citosólico en

comparación a BMMCs WT estimuladas con 9 ng/ml de antígeno. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la cinasa Lyn es crítica para promover la entrada de Ca^{2+} tras la activación del receptor FcεRI en BMMCs. Además, nuestros resultados sugieren que la cinasa Lyn es importante para promover una entrada de calcio a través de la apertura de CCTL.

Un estudio realizado por Yoshimaru *et al.*, (2009) demostró que un influjo de calcio sensible a dihidropiridinas inducido por estimulación antigénica vía FcεRI en BMMCs era necesario para aumentar la concentración de calcio citosólico, siempre y cuando la SOCE fuera bloqueada con 2-APB, lo que indica que la entrada de Ca^{2+} a través de CCTL depende del estado de activación de canales CRAC. Esto sugiere la posibilidad de que exista un mecanismo molecular iniciado por la cinasa Lyn que regule la entrada de Ca^{2+} de manera sincrónica y dependiente de la intensidad de estímulo y del tiempo. Esta posibilidad se ha demostrado que ocurre en células T jurkat, neuronas corticales primarias, células HEK 293 y una clona de células del músculo liso vascular transfectadas (Park, Shcheglovitov, & Dolmetsch, 2010; Wang *et al.*, 2010).

La apertura de CCTL por fosforilación directa de tirosinas cinasas de la familia Src ha sido ampliamente demostrada. Un estudio realizado por Wijetunge *et al.*, (2000), demostró una correlación directa entre la actividad de c-Src (un miembro de las SFKs) y la apertura de canales $\text{Ca}_v1.2$ usando distintos inhibidores de tirosinas cinasas en células del músculo liso vascular. Wijetunge *et al.*, (2000), demostró que el residuo de tirosina Y2122 localizado en la cola C-terminal citosólica de la subunidad α_{1C} de canales $\text{Ca}_v1.2$ es el blanco de fosforilación de SFKs, induciendo la apertura de estos canales tras la estimulación con IGF-1 en neuronas granulares del cerebelo. Por otra parte, la fosforilación y apertura de canales $\text{Ca}_v1.2$ mediada por PKC α/β ha sido demostrada en linfocitos T_H2 (Robert *et al.*, 2014). En BMMCs la activación de esta isoforma de la enzima PKC es dependiente de calcio y de diacilglicerol (DAG), un subproducto de la hidrólisis de PIP_2 por la PLC γ activada en una vía dependiente de la cinasa Lyn tras la estimulación antigénica del receptor FcεRI. Por lo tanto, este mecanismo podría explicar que en BMMCs, Lyn genere la apertura de CCTL inducida por un estímulo de alta intensidad con antígeno (10 ng/ml).

Nuestros hallazgos mostraron que el ARNm de CCL2 incremento en respuesta al estímulo de 1 ng/ml con antígeno, pero no mostró sensibilidad a nifedipina. Sin embargo, cuando las BMMCs fueron estimuladas con 10 ng/ml de antígeno, la acumulación del ARNm de CCL2 disminuyó en presencia de nifedipina con respecto a las BMMCs no estimuladas. Este resultado concuerda con la electrofisiología, donde demostramos que la corriente máxima de calcio inducida por un estímulo de alta intensidad presenta mayor sensibilidad a nifedipina, debido a la apertura de CCTL. Por lo tanto, la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ sensible a nifedipina es necesaria para la adecuada acumulación del ARNm de CCL2 inducida por un estímulo de alta intensidad con antígeno en BMMCs. Se sabe que, en el gen de CCL2 hay dos sitios de unión al factor de transcripción NF- κ B (Ueda, Ishigatsubo, Okubo, &

Yoshimura, 1997). A su vez, el NF- κ B es activado corriente abajo en la cascada de señalización del receptor Fc ϵ RI vía Lyn/PLC γ /PKC α/β , lo que explica la acumulación del gen de CCL2 en este contexto.

Gonzalez-Espinosa *et al.*, (2003), demostraron una elevada acumulación del ARNm de CCL2 en BMMCs utilizando 1 ng/ml, siendo mayor con estímulos de alta intensidad con antígeno (10 y 100 ng/ml). En otro estudio, Eglite *et al.*, (2003), demostraron en células cebadas de leucemia de rata (RBL-2H3) que, la inducción de la síntesis y secreción de la quimiocina CCL2 no depende del tiempo en el que permanecen agregados los receptores Fc ϵ RI, sino del aumento del calcio intracelular que ocurre a tiempos tempranos de la agregación de los receptores Fc ϵ RI. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la acumulación del ARNm de CCL2 depende de manera importante de un influjo de calcio específico (a través de CCTL) cuando la intensidad del estímulo con antígeno es alta en BMMCs (Figura 19).

En este trabajo, también evaluamos la función del Ca²⁺ proveniente de CCTL en la acumulación del ARNm de la citocina IL-3 inducida a diferentes intensidades de estímulo. La acumulación del ARNm de IL-3 inducido por 1 ng/ml de antígeno fue muy sensible a nifedipina, fenómeno que no se observó con 10 ng/ml de antígeno. Sin embargo, la nifedipina no indujo una disminución, sino un aumento sobre la acumulación del ARNm de IL-3 inducido por un estímulo de baja intensidad. Tomando en cuenta los resultados que obtuvimos sobre los registros de las corrientes de Ca²⁺ en BMMCs WT, un estímulo de baja intensidad con antígeno promueve una $I_{Ca^{2+}}$ tardía sensible a nifedipina, dicha entrada de Ca²⁺ proveniente de CCTL podría estar regulando un mecanismo molecular dependiente de calcio que este deteniendo la acumulación del ARNm de IL-3 en respuesta a una estimulación de baja intensidad antigénica en BMMCs.

Wodnar-Filipowicz & Moroni, (1990), demostraron en una línea de células cebadas PB-3c de ratón que la acumulación del ARNm de IL-3 incrementa al utilizar el ionóforo de calcio A23187. De manera interesante, los autores demostraron que la acumulación del ARNm de IL-3 inducida por un aumento de calcio intracelular se debía a un evento postranscripcional y no transcripcional. Esto concuerda con nuestros resultados, debido a que encontramos que la acumulación del ARNm para IL-3 (inducida por un estímulo de baja intensidad) guarda una fuerte dependencia al Ca²⁺. Sin embargo, observamos un efecto interesante cuando se bloqueó selectivamente la entrada de Ca²⁺ proveniente de CCTL, ya que observamos que la acumulación del ARNm para IL-3 aumenta de manera importante. En un estudio reportado por Ming *et al.*, (2001), se demostró en células NIH 3T3 que, el ARNm de IL-3 puede ser estabilizado por HuR, una proteína estabilizadora de unión a un elemento rico en adenina-uracilo (AU) localizado en la región 3'-UTR (ARE, por sus siglas en inglés), que es regulada por p38, una MAPK. De igual manera, los autores demostraron que el ARNm de IL-3 es desestabilizado por tristetraprolina (TTP), una proteína desestabilizadora de

unión a ARE rico en AU. Por lo tanto, esta podría ser una explicación de un posible mecanismo en la regulación de la acumulación del ARNm de IL-3 en BMMCs. La estimulación antigénica en BMMCs conduce a la inmediata activación de p38 MAPK corriente abajo en la cascada de señalización del receptor FcεRI, de esta manera, p38 podría activar a HUR y estabilizar el ARNm de IL-3 y, por ende, un aumento en su acumulación. Por otro lado, una corriente de calcio proveniente de CCTL es activada vía FcεRI, con un consecuente aumento de la concentración de calcio intracelular, suficiente para inducir a la fosfatasa dependiente de calcio PP2A y/o a la fosfatasa calcineurina, las cuales, pueden desfosforilar a TTP y activarla (Sandler & Stoecklin, 2008). De este modo, TTP podría competir por la región ARE rica en AU del ARNm de IL-3 y desestabilizarlo, para finalmente frenar de forma gradual su acumulación. Por esta razón, al haber inhibido la corriente de calcio proveniente de CCTL con nifedipina, la activación de TTP pudo no haberse provocado y, por lo tanto, se favoreció la estabilización y acumulación del ARNm de IL-3 (Figura 19).

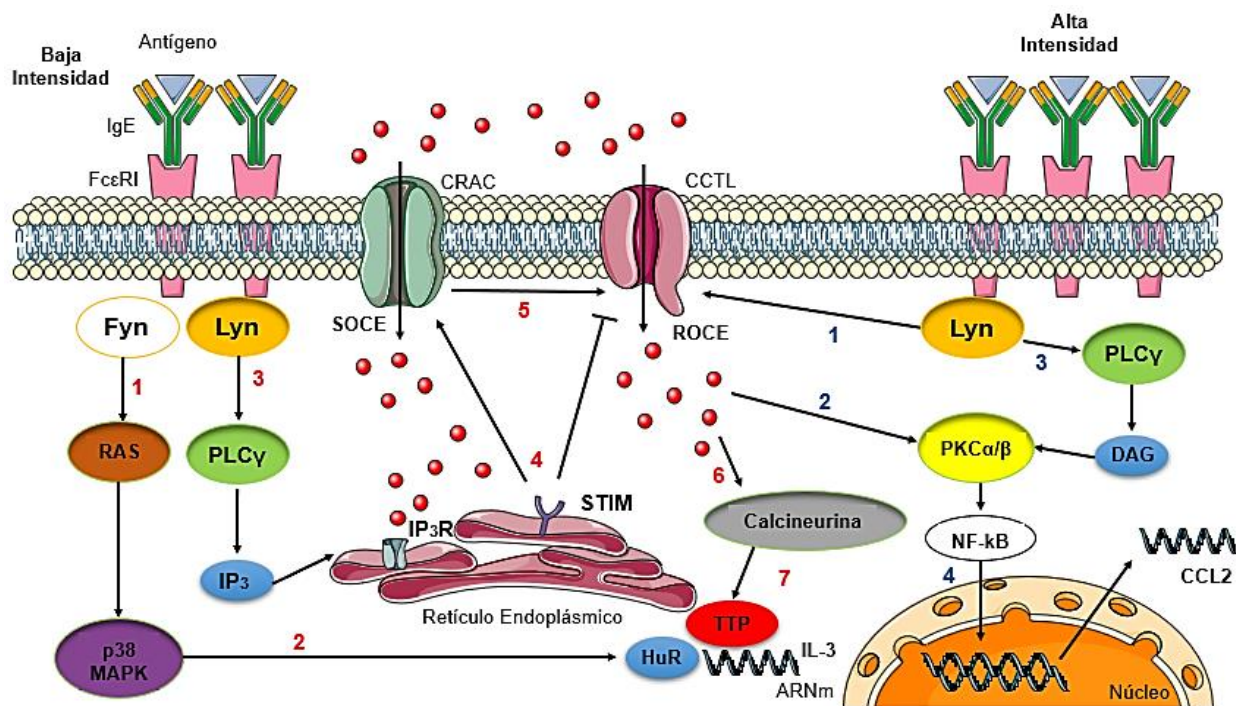


Figura 19. Esquema del mecanismo general propuesto para la activación de CCTL y la función de la $I_{Ca^{2+}}$ a través de CCTL en la acumulación del ARNm de citocinas en respuesta a diferentes niveles de activación del FcεRI en MC. La estimulación de baja intensidad con antígeno genera la formación de pocos agregados de receptores FcεRI, lo que genera 1) la activación de la MAPK p38 a través de una vía de señalización iniciada por la cinasa Fyn. 2) p38 activa a la proteína HuR, la cual estabiliza el ARNm de IL-3. De manera simultánea, 3) la estimulación de baja intensidad induce la activación de la cinasa Lyn y promueve la salida de Ca^{2+} desde el RE vía PLCγ/IP₃. 4) La proteína STIM localizada en el RE se activa y permite la entrada de calcio a través de canales CRAC (SOCE) para el relleno de Ca^{2+} del RE, al mismo tiempo que STIM inhibe la entrada de calcio a través de CCTL (ROCE). 5) Una activación de CCTL sucede de manera dependiente y posterior a la SOCE. 6) El Ca^{2+} que entra a través de CCTL permite la activación de la fosfatasa calcineurina, la cual desfosforila y activa a TTP. TTP compite con HuR por la región 3'-UTR del ARNm de

IL-3 para de esta manera desestabilizarlo y “frenar” su acumulación. Por otro lado, la estimulación de alta intensidad con antígeno genera la formación de un mayor número de receptores FcεRI agregados. 1) Esto produce una activación de los CCTL veloz dependiente de la cinasa Lyn, permitiendo la entrada de Ca²⁺ necesaria para 2) la activación de la PKCα/β. 3) La PKCα/β también requiere de la síntesis de DAG para su activación. El DAG es sintetizado por la PLCγ, la cual es activada por un mecanismo dependiente de la cinasa Lyn. De esta manera, la PKCα/β promueve la activación del factor de transcripción NF-κB corriente abajo en la cascada de señalización. 4) El NF-κB se transloca al núcleo y permite la acumulación del ARNm de CCL2. El mecanismo propuesto de señalización inducido por un estímulo de baja intensidad es seguido por los números en color rojo y el mecanismo propuesto de señalización inducido por un estímulo de alta intensidad es seguido por los números en color azul.

La dependencia de la acumulación de ARNm de citocinas a mecanismos de entrada de calcio específicos también se ha estudiado en células cebadas que no expresan a la proteína STIM, una proteína localizada en el retículo endoplásmico, que es importante para inducir la corriente SOCE. Un estudio realizado por Baba *et al.*, (2008) demostró en MC de hígado fetal que la acumulación de los ARNm de varias citocinas, incluida la IL-6, dependen de la expresión y función de STIM, por lo que, demuestra una fuerte dependencia de la acumulación del ARNm de las citocinas a un mecanismo de entrada de calcio específico (en este caso la SOCE). Por esta razón, se vuelve importante estudiar la participación de la entrada de calcio a través de diferentes canales de calcio en la síntesis de citocinas en MC.

En un contexto clínico, las reacciones alérgicas se caracterizan por la producción desregulada del anticuerpo IgE. Las personas que desarrollan esta condición presentan respuestas inmunológicas exageradas frente a estímulos ambientales normalmente inocuos, estas personas son llamadas atópicas. Por lo tanto, las reacciones inmunitarias exageradas producen daños graves en el organismo que alteran la condición y estilo de vida de las personas, e incluso pueden llevar a la muerte, como es el caso de la anafilaxia, una reacción alérgica capaz de dañar múltiples órganos del organismo. En este contexto, se vuelve un tema de interés describir los mecanismos por los cuales las MC producen y liberan de forma masiva mediadores químicos frente a un estímulo de alta intensidad que provoca reacciones alérgicas graves en el organismo, ya que esto puede llevar en un futuro al desarrollo de potenciales fármacos dirigidos a blancos terapéuticos novedosos para inhibir la síntesis y secreción de mediadores químicos en MC.

7. CONCLUSIONES.

- 1) Una $I_{Ca^{2+}}$ a través de CCTL inducida en respuesta a una estimulación de alta intensidad con antígeno contribuye a un aumento en la acumulación del ARNm de CCL2. Mientras que, una $I_{Ca^{2+}}$ a través de CCTL inducida en respuesta a una estimulación de baja intensidad con antígeno contribuye a una disminución en la acumulación del ARNm de IL-3.
- 2) La activación de la cinasa Lyn en la vía de transducción de señales del receptor FcεRI es necesaria para inducir una $I_{Ca^{2+}}$ sensible a nifedipina.

- 3) La activación de BMMCs a través del FcεRI a diferentes intensidades de estimulación induce una $I_{Ca^{2+}}$ que cumple con algunas características de un CCTL: Es sensible a nifedipina, conduce una $I_{Ba^{2+}}$ y es sensible a un bloqueo por Ba^{2+} .

8. PERSPECTIVAS.

- Estudiar mediante registros electrofisiológicos la posible participación de la cinasa Fyn en la apertura de canales de calcio tipo L inducida por un estímulo de baja y alta intensidad con antígeno en BMMCs Fyn^{-/-} utilizando nifedipina como bloqueador selectivo de estos canales.
- Realizar experimentos de inmunofluorescencia mediante un ensayo de ligación por proximidad (PLA, por sus siglas en inglés) sobre una posible interacción entre la cinasa Lyn y la subunidad α_{1C} de los CCTL en BMMCs WT, como un posible mecanismo de apertura de estos canales a través de una fosforilación inducida con 1 y 10 ng/ml de antígeno.
- Caracterizar la participación de otros canales de calcio, como ORAI y TRPs, en la corriente máxima de calcio inducida con 1 y 10 ng/ml de antígeno mediante el uso de bloqueadores selectivos de cada uno de los canales realizando registros electrofisiológicos con la técnica de patch clamp.
- Realizar experimentos de PCR en tiempo real para estudiar a fondo la función de la entrada de calcio a través de CCTL inducido por la estimulación de baja y alta intensidad con antígeno sobre la acumulación de los ARNm de las citocinas IL-3 y CCL2 en BMMCs.
- Estudiar el mecanismo por el cual la $I_{Ca^{2+}}$ a través de CCTL inducido por la estimulación antigénica está afectando la acumulación del ARNm de IL-3 y CCL2 con el uso de actinomicina D (un inhibidor de la transcripción génica) en BMMCs, realizando experimentos de PCR en tiempo real.

9. BIBLIOGRAFIA.

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2015). Alergia. In *Inmunología celular y molecular* (pp. 417–434).
- Akha, A. A. S., Willmott, N. J., Brickley, K., Dolphin, A. C., Galione, A., & Hunt, S. V. (1996). Anti-Ig-induced calcium influx in rat B lymphocytes mediated by cGMP through a dihydropyridine-sensitive channel. *Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7297–7300.
- Antony, C., Mehto, S., Tiwari, B. K., Singh, Y., & Natarajan, K. (2015). Regulation of L-type voltage gated calcium channel CACNA1S in macrophages upon Mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS ONE*, 10(4), 1–18.
- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M. F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Akashi, K. (2005).

- Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18105–18110.
- Armstrong, C. M., & Matteson, D. R. (1985). Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science*, 227(4682), 65–67.
- Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2008). Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nature Immunology*, 9(1), 81–88.
- Badou, A., Jha, M. K., Matza, D., Mehal, W. Z., Freichel, M., Flockerzi, V., & Flavell, R. A. (2006). Critical role for the β regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15529–15534.
- Bankova, L. G., Dwyer, D. F., Liu, A. Y., Austen, K. F., & Gurish, M. F. (2015). Maturation of mast cell progenitors to mucosal mast cells during allergic pulmonary inflammation in mice. *Mucosal Immunology*, 8(3), 596–606.
- Benditt, E. P., & Arase, M. (1959). An enzyme in mast cells with properties like chymotrypsin. *The Journal of Experimental Medicine*, 110, 451–460.
- Berridge, M. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 21, 13–26.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235–238.
- Blank, U., & Rivera, J. (2004). The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends in Immunology*, 25(5), 266–273.
- Bodi, I., Akhter, S. A., Schwartz, A., Mikala, G., & Koch, S. E. (2005). The L-type calcium channel in the heart : the beat goes on. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3306–3317.
- Bradding, P., Feather, I. H., Howarth, P. H., Mueller, R., Roberts, J. A., Britten, K., ... Holgate, S. T. (1992). Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *Journal of Experimental Medicine*, 176(5), 1381–1386.
- Bronner, C., Mousli, M., Eleno, N., & Landry, Y. (1989). Resting plasma membrane potential of rat peritoneal mast cells is set predominantly by the sodium pump. *FEBS Letters*, 255(2), 401–404.

- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 411–425.
- Chelombitko, M. A., Fedorov, A. V., Ilyinskaya, O. P., Zinovkin, R. A., & Chernyak, B. V. (2016). Role of reactive oxygen species in mast cell degranulation. *Biochemistry (Moscow)*, 81(12), 1564–1577.
- Chen, C.-C., Grimaldeston, M. A., Tsai, M., Weissman, I. L., & Galli, S. J. (2005). Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32), 11408–11413.
- Collington, S. J., Hallgren, J., Pease, J. E., Jones, T. G., Rollins, B. J., Westwick, J., Weller, C. L. (2010). The Role of the CCL2/CCR2 Axis in Mouse Mast Cell Migration In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 184(11), 6114–6123.
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), 503–508.
- Do Heo, W., Meyer, T., Myers, J. W., Kim, M. L., Liou, J., Ferrell, J. E., & Jones, J. T. (2005). STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx. *Current Biology*, 15(13), 1235–1241.
- Eglite, S., Morin, J. M., & Metzger, H. (2003). Synthesis and Secretion of Monocyte Chemotactic Protein-1 Stimulated by the High Affinity Receptor for IgE. *The Journal of Immunology*, 170(5), 2680–2687.
- Feske, S., Wulff, H., & Skolnik, E. Y. (2015). *Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. Annual Review of Immunology* (Vol. 33).
- Florenzano, F., & Bentivoglio, M. (2000). Degranulation, density, and distribution of mast cells in the rat thalamus: A light and electron microscopic study in basal conditions and after intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *Journal of Comparative Neurology*, 424(4), 651–669.
- Frossi, B., Mion, F., Sibilano, R., Danelli, L., & Pucillo, C. E. M. (2018). Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunological Reviews*, 282(1), 35–46.
- Gautier, G., Hoeffel, G., Ginhoux, F., Gentek, R., Chen, J., Bajénoff, M., Msallam, R. (2018). Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity*, 48(6), 1160-1171.
- Glenner, George G., Cohen, L. A. (1960). Histochemical Demonstration of a Species-Specific

- Trypsin-like Enzyme in Mast Cells. *Nature*, 185(4716), 846–847.
- Gonzalez-Espinosa, C., Odom, S., Olivera, A., Hobson, J. P., Cid Martinez, M. E., Oliveira-dos-Santos, A., Rivera, J. (2003). Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197(11), 1453–1465.
- Gordon, J., & Galli, S. (1990). Mast Cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachetin. *Nature*, 346(July), 274–276.
- Grafton, G., Stokes, L., Toellner, K. M., & Gordon, J. (2003). A non-voltage-gated calcium channel with L-type characteristics activated by B cell receptor ligation. *Biochemical Pharmacology*, 66(10), 2001–2009.
- Heizer, J. W., Davenport, B., Schmitz, C., Perraud, A.-L., & Li, Y. (2015). Signature Channels of Excitability no More: L-Type Channels in Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 6(July), 1–13.
- Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., & Wegener, J. W. (2014). L-Type CaV1.2 Calcium Channels: From In Vitro Findings to In Vivo Function. *Physiological Reviews*, 94(1), 303–326.
- Hoth, M., & Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355, 353–356.
- Hoth, M., & Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *Journal of Physiology*, 465, 359–386.
- Irani, A. A., Schechter, N. M., Craig, S. S., DeBlois, G., & Schwartz, L. B. (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), 4464–4468.
- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40(7), 1830–1835.
- Kinet, J.-P. (1999). THE HIGH-AFFINITY I g E RECEPTOR (Fc ϵ RI): From Physiology to Pathology. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 931–972.
- Kraft, S., & Kinet, J. P. (2007). New developments in Fc ϵ RI regulation, function and inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 365–378.
- LINDSTEDT, K. A., WANG, Y., SHIOTA, N., SAARINEN, J., HYYTIÄINEN, M., KOKKONEN, J. O., KOVANEN, P. T. (2001). Activation of paracrine TGF- β 1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. *The FASEB Journal*,

15(8), 1377–1388.

- MacGlashan, D., & Guo, C. B. (1991). Oscillations in free cytosolic calcium during IgE-mediated stimulation distinguish human basophils from human mast cells. *Journal of Immunology*, 147(7), 2259–2269.
- Matthews, B. Y. G., Neher, E., & Penner, R. (1989). Second messenger-activated calcium influx. *Journal of Physiology*, (418), 105–130.
- Meurer, S. K., Neß, M., Weiskirchen, S., Kim, P., Tag, C. G., Kauffmann, M., Weiskirchen, R. (2016). Isolation of mature (Peritoneum-Derived) mast cells and immature (Bone Marrow-Derived) mast cell precursors from mice. *PLoS ONE*, 11(6), 1–16.
- Mikoshiba, K., & Hattori, M. (2000). IP₃ Receptor-Operated Calcium Entry. *Cell Calcium*, 3(September), 1–3.
- Ming, X.-F., Stoecklin, G., Lu, M., Looser, R., & Moroni, C. (2001). Parallel and Independent Regulation of Interleukin-3 mRNA Turnover by Phosphatidylinositol 3-Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), 5778–5789.
- Moon, T. C., St Laurent, C. D., Morris, K. E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y., & Befus, A. D. (2010). Advances in mast cell biology: New understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunology*, 3(2), 111–128.
- Moon, Tae Chul, Dean Befus, A., & Kulka, M. (2014). Mast cell mediators: Their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in Immunology*, 5(NOV), 1–18.
- Nakamura, Y., Franchi, L., Kambe, N., Meng, G., Strober, W., & Núñez, G. (2012). Critical Role for Mast Cells in Interleukin-1 β -Driven Skin Inflammation Associated with an Activating Mutation in the Nlrp3 Protein. *Immunity*, 37(1), 85–95.
- Nautiyal, K. M., Liu, C., Dong, X., & Silver, R. (2011). Blood-borne donor mast cell precursors migrate to mast cell-rich brain regions in the adult mouse. *Journal of Neuroimmunology*, 240–241, 142–146.
- Oliver, C., Jamur, M. C., Grodzki, A. C. G., Berenstein, E. H., Hamawy, M. M., & Siraganian, R. P. (2005). Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood*, 105(11), 4282–4289.
- Olivera, A., Mizugishi, K., Tikhonova, A., Ciaccia, L., Odom, S., Proia, R. L., & Rivera, J. (2007). The Sphingosine Kinase-Sphingosine-1-Phosphate Axis Is a Determinant of Mast Cell Function and Anaphylaxis. *Immunity*, 26(3), 287–297.

- Omilusik, K., Priatel, J. J., Chen, X., Wang, Y. T., Xu, H., Choi, K. B., Jefferies, W. A. (2011). The CaV1.4 Calcium Channel Is a Critical Regulator of T Cell Receptor Signaling and Naive T Cell Homeostasis. *Immunity*, 35(3), 349–360.
- Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810.
- Park, C. Y., Shcheglovitov, A., & Dolmetsch, R. (2010). The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science*, 330(6000), 101–105.
- Parravicini, V., Gadina, M., Kovarova, M., Odom, S., Gonzalez-Espinosa, C., Furumoto, Y., Rivera, J. (2002). Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nature Immunology*, 3(8), 741–748.
- Penner, R., Matthews, B. Y. G., & Neher, E. (1988). Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature*, 334(11), 499–504.
- Reuter, H. (1983). Calcium Channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs, 1983.
- Riley, J. F. (1953). Histamine in Tissue Mast Cells. *Science*, 118(3064), 332–333.
- Robert, V., Triffaux, E., Paulet, P. E., Guéry, J. C., Pelletier, L., & Savignac, M. (2014). Protein kinase C-dependent activation of CaV1.2 channels selectively controls human TH2-lymphocyte functions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(4).
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *Journal of Cell Biology*, 169(3), 435–445.
- Rowley, D. A., & Benditt, E. P. (1955). 5-Hydroxytryptamine and Histamine as Mediators of the Vascular Injury Produced by Agents Which Damage Mast Cells in Rats. *The Journal of Experimental Medicine*, 103, 399–411.
- Saito, H., Matsumoto, K., Okumura, S., Kashiwakura, J., Oboki, K., Yokoi, H., Okayama, Y. (2006). Gene Expression Profiling of Human Mast Cell Subtypes: An In Silico Study. *Allergology International*, 55(2), 173–179.
- Sanchez-Miranda, E., Ibarra-Sanchez, A., & Gonzalez-Espinosa, C. (2010). Fyn kinase controls FcεRI receptor-operated calcium entry necessary for full degranulation in mast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(4), 1714–1720.
- Sandler, H., & Stoecklin, G. (2008). Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin. *Biochemical Society Transactions*, 36(3), 491–496.

- Schwartz, L. B., & Austen, K. F. (1980). Enzymes of the mast cell granule. *Journal of Investigative Dermatology*, 74(5), 349–353.
- Schwartz, Lawrence B, Austen, K. F., & Stephen, I. (1979). Immunologic Release of β - Hexosaminidase and β -Glucuronidase from Purified Rat Serosal Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 123(4), 1445–1450.
- Sharma, D., Tiwari, B. K., Mehto, S., Antony, C., Kak, G., Singh, Y., & Natarajan, K. (2016). Suppression of protective responses upon activation of L-type voltage gated calcium channel in macrophages during Mycobacterium bovis BCG infection. *PLoS ONE*, 11(10), 1–22.
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24–45.
- Sjoerdsma, A., Waalkes, T.P., & Weissbach, H. (1957). Serotonin and Histamine in Mast Cells. *Science*, 125(3259), 1202–1203.
- Striz, I. (2017). Cytokines of the IL-1 family: Recognized targets in chronic inflammation underrated in organ transplantations. *Clinical Science*, 131(17), 2241–2256.
- Suzuki, Y., Inoue, T., & Ra, C. (2010). L-type Ca^{2+} channels: A new player in the regulation of Ca^{2+} signaling, cell activation and cell survival in immune cells. *Molecular Immunology*, 47(4), 640–648.
- Suzuki, Y., Inoue, T., & Ra, C. (2012). Calcium signaling in Mast Cells: Focusing on L-Type Calcium Channels. In *Calcium Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 955–976).
- Suzuki, Y., Yoshimaru, T., Inoue, T., Nunomura, S., & Ra, C. (2008). The high-affinity immunoglobulin E receptor (Fc ϵ RI) regulates mitochondrial calcium uptake and a dihydropyridine receptor-mediated calcium influx in mast cells: Role of the Fc ϵ RI β chain immunoreceptor tyrosine-based activation motif. *Biochemical Pharmacology*, 75(7), 1492–1503.
- Suzuki, Y., Yoshimaru, T., Inoue, T., & Ra, C. (2009a). Cav1.2 L-type Ca^{2+} channel protects mast cells against activation-induced cell death by preventing mitochondrial integrity disruption. *Molecular Immunology*, 46(11–12), 2370–2380.
- Suzuki, Y., Yoshimaru, T., Inoue, T., & Ra, C. (2009b). Discrete generations of intracellular hydrogen peroxide and superoxide in antigen-stimulated mast cells: Reciprocal regulation of store-operated Ca^{2+} channel activity. *Molecular Immunology*, 46(11–12), 2200–2209.
- Takahashi, M., Seagart, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F. X., & Catterall, W. a. (1987). Subunit

- structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84(August), 5478–5482.
- Ueda, A., Ishigatsubo, Y., Okubo, T., & Yoshimura, T. (1997). Transcriptional Regulation of The Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 31092–31099.
- Wajdner, H. E., Farrington, J., Barnard, C., Peachell, P. T., Schnackenberg, C. G., Marino, J. P., Seward, E. P. (2017). Orai and TRPC channel characterization in FcεRI-mediated calcium signaling and mediator secretion in human mast cells. *Physiological Reports*, 5(5), 1–17.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Gill, D. L. (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science*, 330(6000), 105–109.
- Wijetunge, S., Lymn, J. S., & Hughes, A. D. (2000). Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on voltage-operated calcium channel currents in vascular smooth muscle cells and pp60(c-src) kinase activity. *British Journal of Pharmacology*, 129(7), 1347–1354.
- Wodnar-Filipowicz, A., & Moroni, C. (1990). Regulation of interleukin 3 mRNA expression in mast cells occurs at the posttranscriptional level and is mediated by calcium ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(2), 777–781.
- Yoshimaru, T., Suzuki, Y., Inoue, T., & Ra, C. (2009). L-type Ca²⁺ channels in mast cells: Activation by membrane depolarization and distinct roles in regulating mediator release from store-operated Ca²⁺ channels. *Molecular Immunology*, 46(7), 1267–1277.
- Yoshimura, T. (2018). The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: A foe or ally? *Cellular and Molecular Immunology*, 15(4), 335–345.
- Zocchi, M. R., Rubartelli, A., Morgavi, P., & Poggi, A. (1998). HIV-1 tat inhibits human natural killer cell function by blocking L- type calcium channels. *Journal of Immunology*, 161(6), 2938–2943.