



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Participación del canal receptor de potencial transitorio TRPV1 en la
estimulación dependiente del receptor FcεRI en células cebadas**

Tesis que presenta:

**MARÍA JAQUELYNE JUG LÓPEZ
MÉDICO CIRUJANO**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN
NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL**

Directores de Tesis:

**DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA
DR. EMILIO JAVIER GALVÁN ESPINOSA**

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en los laboratorios N°11 y N°9 del Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV, Unidad Sede Sur. Durante el desarrollo de esta tesis, se contó con el apoyo de los proyectos CF-2019-51488 y CB-281617, así como con la beca N° 1008645 otorgados por el CONACyT.

Debido a dificultades derivadas de la pandemia de COVID 19, algunos de los experimentos de desgranulación fueron realizados por la M. en C. Rubí Monserrat Osorio Pérez.

Índice general

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos generales de las células cebadas	2
1.1.1 Morfología	2
1.1.2 Subtipos de células cebadas	3
1.1.3 Contenido granular	5
1.2 Activación de células cebadas dependiente del FcεRI	8
1.3 Receptor FcεRI	9
1.3.1 Vías de señalización activadas por la estimulación del receptor FcεRI en células cebadas	10
1.4 Mecanismos de desgranulación en células cebadas	12
1.5 Señalización por calcio en células cebadas	13
1.5.1 Mecanismos de entrada de calcio extracelular en células cebadas	14
1.5.2 Fuerza impulsora para la entrada de calcio y regulación del potencial de membrana.....	16
1.6 Canales receptores de potencial transitorio.....	17
1.6.1 Estructura de los TRPs y mecanismo de apertura.....	19
1.6.2. Canales TRP en células cebadas.....	20
1.7 TRPV1	20
1.8 Medición de la movilización de calcio.....	23
1.8.1 Registro electrofisiológico de células cebadas.....	25
1.9 Antecedentes	25
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVO GENERAL	27
5. OBJETIVOS PARTICULARES	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Generación, cultivo y sensibilización de BMMCs.....	28
6.1.1. Animales	28
6.1.2 Cultivo para BMMCs.....	28
6.1.3 Sensibilización de BMMCs	29
6.2 Reactivos	29
6.3 Electrofisiología.....	29
6.4 Determinación de β-hexosaminidasa	31
6.5 PCR genómico para genotipificación.....	31
6.6 Análisis estadístico.....	32
7. RESULTADOS	33
7.1. Las BMMCs tienen un potencial de membrana en reposo negativo	33
7.2. El TRPV1 es funcional en las BMMCs, se abre en respuesta a la activación del FcεRI y es sensible a la inhibición por capsazepina	34
7.3. El TRPV1 participa en los cambios en el área de superficie celular que ocurren como resultado de la activación del FcεRI.....	37
7.4. La apertura del canal TRPV1 inhibe la liberación de β-hexosaminidasa en BMMCs activadas a través del FcεRI.....	38

7.5. La cinasa Lyn no participa de manera importante en los cambios en el área de superficie celular que resultan de la activación del FcεRI y esos cambios son sensibles a la inhibición por capsazepina.....	41
7.6. La cinasa Lyn modula la movilización de calcio y la apertura del TRPV1 membranar en BMMCs activadas por el FcεRI	43
8. DISCUSIÓN	45
8.1. Diferencias en el potencial de membrana en reposo entre las células cebadas y las células excitables	45
8.2. Características de la corriente de calcio a través de canales iónicos membranales en las células cebadas	48
8.3. La estimulación de células cebadas provoca cambios en el área de superficie celular	50
8.4. Efectos de los agonistas y antagonistas del TRPV1 en la activación del FcεRI en células cebadas.....	53
8.5. Papel de la cinasa Lyn y del TRPV1 en la exocitosis activada por la estimulación del FcεRI en células cebadas.....	56
8.6. Papel de la cinasa Lyn en la movilización de calcio en células cebadas activadas a través del receptor FcεRI.....	58
9. CONCLUSIONES	61
10. PERSPECTIVAS.....	62
11. ANEXOS	63
12. MATERIAL SUPLEMENTARIO	66
13. REFERENCIAS.....	67

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de células cebadas.....	3
Figura 2. Estructura del FcεRI y efectos biológicos de su activación.....	9
Figura 3. Sistema de señalización activado por la estimulación del receptor FcεRI y los mecanismos de entrada de calcio en células cebadas.....	11
Figura 4. Mecanismos de entrada de Ca ²⁺ a las células cebadas.....	15
Figura 5. Diferencias en la función de los TRPs en células excitables y no excitables	18
Figura 6. Aspectos estructurales y regulación del TRPV1	22
Figura 7. Comparación de dos técnicas de medición de calcio aplicadas a células cebadas	24
Figura 8. Potencial de membrana en reposo registrado en BMMCs WT de ratón.....	34
Figura 9. Registro electrofisiológico de la corriente activada a través del FcεRI en BMMCs WT de ratón y la participación del canal TRPV1	36
Figura 10. Participación del TRPV1 en los cambios en el área de superficie de la membrana de BMMCs WT de ratón en respuesta a la estimulación dependiente del FcεRI.....	38
Figura 11. Curvas concentración respuesta de la inhibición del canal TRPV1 por capsazepina en BMMCs WT de ratón activadas a través del FcεRI.....	39
Figura 12. Curvas concentración respuesta de la inhibición del canal TRPV1 por AMG 9810 en BMMCs WT de ratón activadas a través del FcεRI.....	40
Figura 13. Curvas concentración respuesta de la apertura del canal TRPV1 en BMMCs WT de ratón activadas a través del FcεRI	41
Figura 14. Registro electrofisiológico de los cambios en la capacitancia de la membrana de BMMCs de ratones Lyn -/- por la activación del FcεRI y el efecto de la inhibición del TRPV1.	42
Figura 15. Registro electrofisiológico de la corriente activada por la estimulación dependiente del FcεRI en BMMCs de ratones Lyn -/- y la participación del TRPV1	44
Figura 16. La exocitosis viene acompañada de varias formas de endocitosis compensatoria en células cebadas.....	52
Figura 17. Efectos de la apertura del TRPV1 en respuesta a la activación del FcεRI en BMMCs de ratón.....	59

Índice de tablas

Tabla 1: Principales mediadores almacenados en gránulos de células cebadas	6
--	---

Índice de abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
Ag	Antígeno
BMMCs	Células cebadas derivadas de la médula ósea
BSA	Albúmina sérica bovina
BTK	Proteína tirosina cinasa de Bruton
C-terminal	Carboxilo terminal
Ca ²⁺	Calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
CaN	Calcineurina o PP2B
CaM	Calmodulina
CaMKII	Cinasa II dependiente de calcio/calmodulina
CCs	Células cebadas o mastocitos
Cs ⁺	Cesio
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
Cinvestav	Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.
Cm	Capacitancia de la membrana celular
CO ₂	Dióxido de carbono
CPA3	Carboxipeptidasa A3
CTMCs	Células cebadas del tejido conectivo
DAG	Diacyl-glicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP-HSA	Dinitrofenil acoplado a la albúmina en suero humano
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FBS	Suero fetal bovino
Fc	Fracción cristalizable
FcεRI	Receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina tipo E
HEK-293	Células embrionarias de riñón humano 293
HMC-1	Línea celular de leucemia humana
HPBDMC	Células cebadas derivadas de sangre periférica humana
/	Corriente
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato
IP ₃ R	Receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato
ITAMs	Motivos de activación basados en inmutirosina
V	voltaje
V-/I	Relación voltaje corriente
K ⁺	Potasio
LAT	Proteína adaptadora para la activación de células T
Li ⁺	Litio
Mano EF	Dominio de unión a Ca ²⁺
MCCs	Células cebadas que producen quimasa
MCTs	Células cebadas que producen triptasa
MCTCs	Células cebadas que producen quimasa y triptasa
mIgE	IgE en su forma monomérica
MIRRs	Receptores multicadena de reconocimiento inmunitario
MMCs	Células cebadas de las mucosas
mMCP	Proteasa de células cebadas de ratón

mOSm	Miliosmoles
Na ⁺	Sodio
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NOM	Norma oficial mexicana
No-SOCE	Entrada de calcio independiente del agotamiento de depósitos de calcio
NTAL	Adaptador para la activación de células distintas a los linfocitos T
N-terminal	Dominio o extremo amino terminal
ORAI1	Modulador de calcio activado por liberación de calcio 1
PI ₃ K	Fosfatidil-inositol-3-cinasa
pS	Pico siemens
PIP ₂	Fosfatidil-inositol 4, 5-bifosfato
PIP ₃	Fosfatidil-inositol 3, 4, 5-trifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC _γ	Fosfolipasa C _γ
PM	Potencial de membrana celular
PMR	Potencial de membrana en reposo
PMCs	Células cebadas derivadas de peritoneo
PP2B	Proteína fosfatasa 2B o CaN o PP3
Rb ⁺	Rubidio
RBL-2H3	Células de leucemia basofílica de rata
RE	Retículo endoplásmico
Rpm	Revoluciones por minuto
ROCE	Entrada de calcio operada por receptor
ROCs	Canales activados por receptor
SCF	Factor de células troncales
ST	Segmento transmembranal
SERCA	Bomba ATP-asa de calcio del retículo sarco/endoplásmico
SFB	Suero fetal bovino
SNAREs	Receptores de SNAP
SOCE	Entrada de calcio operada por depósitos
SOCs	Canales de calcio activados por depósitos
Sr ²⁺	Estroncio
STIM1	Molécula de interacción estromal 1
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRP	Canal receptor de potencial transitorio
TRPA	Canales de receptor de potencial transitorio tipo anquirina
TRPC	Canal receptor de potencial transitorio tipo canónico
TRPM	Canal receptor de potencial transitorio tipo melastatina
TRPML	Canal receptor de potencial transitorio tipo mucolipina
TRPP	Canal receptor de potencial transitorio tipo policistina
TRPV	Canal receptor de potencial transitorio tipo vaniloide
VSLD	Dominio similar al sensor de voltaje
WT	Tipo silvestre C57BL6/J

Resumen

El estudio de proteínas que median la entrada de Ca^{2+} en células cebadas (CCs) ha adquirido gran relevancia debido a que el Ca^{2+} es un importante regulador de la actividad de esa estirpe celular. El TRPV1, un canal catiónico no selectivo y altamente permeable al Ca^{2+} , está expresado en la membrana de las CCs. A pesar de que ese canal ha sido ampliamente estudiado en el sistema nervioso central y periférico, poco se sabe acerca de su función en células eléctricamente no excitables, como las CCs. En este trabajo investigamos si el canal TRPV1 se abre en respuesta a la activación del receptor de alta afinidad para la IgE ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}$) en CCs derivadas de medula ósea (BMMCs) de ratones C57BL/6J, analizando el papel que ejerce en la desgranulación anafiláctica y la participación de la cinasa Lyn en el mecanismo de apertura del canal. Para ello, examinamos la funcionalidad del canal TRPV1 con registros electrofisiológicos en BMMCs WT y Lyn $-/-$ activadas a través del $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$, y registramos los cambios en la corriente iónica utilizando el antagonista del TRPV1 capsazepina. También investigamos los efectos del agonista capsaicina y un antagonista más selectivo del TRPV1, el AMG-9810 en la liberación de la enzima β -hexosaminidasa en respuesta de la activación del $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ en BMMCs. En este trabajo comprobamos que las BMMCs de ratón presentan un potencial de membrana en reposo menos negativo comparado con las células excitables y que la cinasa Lyn no participa de manera importante en la desgranulación anafiláctica. Además, encontramos que el canal TRPV1 es funcional en esas células y que el entrecruzamiento del $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ provoca su apertura. También, descubrimos que el TRPV1 regula negativamente la secreción de β -hexosaminidasa y la desgranulación anafiláctica. Finalmente, este es el primer trabajo en reportar que la cinasa Lyn regula la apertura del TRPV1 tras el entrecruzamiento del $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ en CCs.

Abstract

Because Ca^{2+} is a critical regulator of the mast cell activity, the study of proteins that mediate Ca^{2+} entry into those cells has become significant. TRPV1, is a nonselective and highly Ca^{2+} -permeable cation channel that is expressed in the mast cells membrane. Although this channel has been extensively studied in the peripheral and central nervous systems, little is known about its function in electrically non-excitabile cells, such as mast cells. In this work we investigated whether the TRPV1 channel opens in response to the high-affinity IgE receptor activation (Fc ϵ RI) in bone marrow-derived mast cells (BMMCs) from C57BL/6J mice, analyzing its role in anaphylactic degranulation and the involvement of Lyn kinase in the mechanism of channel opening. For this, we examined the functionality of the TRPV1 channel with patch-clamp electrophysiological recordings in WT and Lyn $-/-$ BMMCs activated through Fc ϵ RI, and the changes in the ionic currents using the TRPV1 antagonist capsazepine were analyzed. In addition, we investigated the effects of the TRPV1 agonist capsaicin and the more selective antagonist AMG-9810 on the release of the enzyme β -hexosaminidase in response to Fc ϵ RI activation in BMMCs. In this work, we demonstrated that mouse BMMCs exhibit a less negative resting membrane potential compared with actual electrically excitable cells and that Lyn kinase is not significantly involved in anaphylactic degranulation. Furthermore, we found that the TRPV1 channel is functional in mast cells and that Fc ϵ RI crosslinking causes its opening. We also discover that TRPV1 negatively regulates β -hexosaminidase secretion and anaphylactic degranulation. Finally, this is the first work to report that Lyn kinase regulates TRPV1 opening after Fc ϵ RI cross-linking in CCs.

1. Introducción

Las células cebadas (CCs) son células no excitables que participan en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Reconocidas por sus funciones efectoras en enfermedades alérgicas e inflamatorias (Dudeck et al., 2019; Elieh Ali Komi et al., 2020; Galli et al., 2011; Siebenhaar et al., 2017), son células de origen hematopoyético (Gentek et al., 2018; Li et al., 2018), de larga vida, caracterizadas por poseer abundantes gránulos citoplasmáticos de diferente estructura y contenido que almacenan mediadores inflamatorios (Dudeck et al., 2019; Frossi et al., 2017; Krystel-Whittemore et al., 2016; Moon et al., 2014).

Bajo la influencia de señales moleculares intercambiadas con el microambiente, las CCs expresan en su membrana una amplia gama de receptores que les permite responder a estímulos múltiples y liberar selectivamente diversos tipos y cantidades de mediadores químicos (Elieh Ali Komi et al., 2020; Frossi et al., 2017, 2018; Gri et al., 2012). El mecanismo más estudiado de activación de las CCs está mediado por la interacción con antígenos (Ags) que inducen la agregación de la inmunoglobulina tipo E (IgE) unida a su receptor de alta afinidad: el FcεRI, expresado en su superficie celular (A. M. Gilfillan & Tkaczyk, 2006; Siebenhaar et al., 2017). La consecuencia final de esa activación es la liberación de diversos compuestos. En primer lugar, se secretan mediadores preformados que se liberan de gránulos secretores (como la histamina, la heparina y diversas proteasas) a través de un proceso denominado desgranulación anafiláctica. Después, se producen mediadores lipídicos sintetizados *de novo* a partir del ácido araquidónico (AA), como los eicosanoides y, al final, se secretan proteínas sintetizadas *de novo*, como diversas citocinas (Blank et al., 2014; Elieh Ali Komi et al., 2020; Marshall, 2004; Moon et al., 2014).

Por otra parte, el entrecruzamiento del receptor FcεRI por el Ag induce la movilización de calcio (Ca²⁺) hacia el citoplasma de las CCs a través de canales de Ca²⁺ expresados en la membrana celular por un mecanismo dependiente de la depleción de depósitos intracelulares de Ca²⁺ denominado SOCE (Store-Operated-Calcium-Entry). Al mismo tiempo, puede ocurrir otro mecanismo independiente de

SOCE mejor conocido como ROCE (Receptor-Operated-Calcium-Entry), en el que ligandos de canales catiónicos no selectivos inducen corrientes de Ca^{2+} activadas por receptor (Hoth et al., 1993; Taberner et al., 2016).

El estudio de las distintas moléculas que median la entrada de Ca^{2+} a las CCs, así como los mecanismos de su apertura tiene gran relevancia porque ese ion media diversas funciones celulares y es un importante regulador de la respuesta inmunitaria (Froghi et al., 2021; Vig & Kinet, 2009). Por ejemplo, ejerce un papel importante en el acoplamiento estímulo-secreción de células excitables como las neuronas, y de células no excitables como las CCs (Blank et al., 2014; Hoth et al., 1993). En estas últimas, tanto el proceso de desgranulación, como la síntesis de derivados del AA, la quimiotaxis y la producción de algunas citocinas dependen en distintos grados de un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), que se obtiene al activar los diferentes mecanismos de salida intracelular y entrada extracelular de ese ion. Conjuntamente, una entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de canales de membrana permeables al Ca^{2+} , es necesaria para la activación completa de las CCs (Hoth & Penner, 1992; Ma & Beaven, 2009; Suzuki et al., 2012; Tshori & Razin, 2010). De esta forma, señales que no inducen una respuesta de Ca^{2+} sustancial (como las generadas por el lipopolisacárido bacteriano a través de receptores tipo Toll), aunque inducen la secreción de citocinas y quimiocinas recién sintetizadas, no inducen desgranulación anafiláctica (Blank et al., 2014; Marshall, 2004).

1.1 Aspectos generales de las células cebadas

1.1.1 Morfología

Las CCs son células grandes y mononucleadas que poseen numerosas microvellosidades largas en su superficie celular (figura 1a), y múltiples protuberancias o caveolas donde la descarga granular tiene lugar (Helander & Bloom, 1974; Schulman et al., 1983). Cabe destacar que la morfología de las CCs varía de acuerdo a su microambiente tisular, por lo que su forma y tamaño no son útiles en su identificación (YONG, 1997).

La característica anatómica más distintiva en las CCs es su alto contenido de gránulos secretores similares a lisosomas (también conocidos como lisosomas secretores, figura 1b). El citoplasma de CCs maduras contiene un promedio de 1000 gránulos que ocupan el 50 – 55 % de su citoplasma. Rodeados de una doble membrana, tienen un tamaño que va desde 300 a 1000 nm y un volumen aproximado de 300 nm³. Usualmente son electro-densos (por la presencia de distintas regiones de núcleo denso dentro de los gránulos), aunque pueden mostrarse electro-luminosos dependiendo de su contenido (Blank et al., 2014; Wernersson & Pejler, 2014; YONG, 1997).

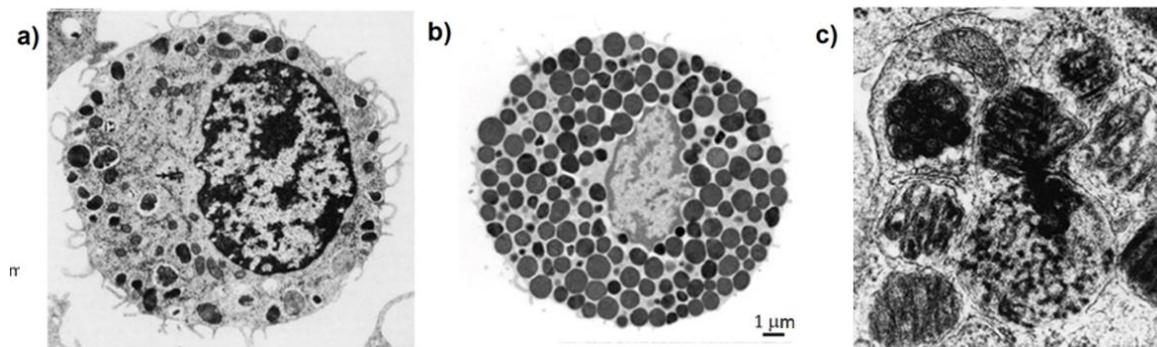


Figura 1. Morfología de células cebadas. a) Electromicrofotografía de una CC de rata mostrando las microvellosidades en la superficie y varios gránulos en diferentes estadios de formación. La flecha muestra el centriolo. Pueden apreciarse mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas y algunos pro-gránulos. b) Electromicrofotografía de una CC de rata llena de gránulos maduros con gran cantidad de material electro-denso que está distribuido uniformemente en la mayor parte de cada gránulo. c) Electromicrofotografía de parte de una CC humana mostrando gránulos con una subestructura de rollos. Adaptada a) y c) de: YONG, L. C. J. (1997). The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 49(6), 409–424. b) de Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: Armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 478–494.

La microscopía electrónica muestra que las CCs tienen una subestructura granular variada de acuerdo con la especie animal que incluye: estructura de rollos, circular, octagonal y cristaloides (figura 1c). La mayor variedad en la forma de los gránulos se ha observado en CCs humanas (YONG, 1997).

1.1.2 Subtipos de células cebadas

En roedores se han descrito dos subtipos principales de CCs en función de su distribución tisular: las CCs de las mucosas (MMCs) y CCs del tejido conectivo (CTMCs).

Las MMCs se encuentran dentro del epitelio del intestino y mucosa respiratoria. Poseen un tamaño promedio de entre 7 - 12 μm . En el adulto, surgen de progenitores de CCs derivados de la médula ósea (BMMCs), y tienen un comportamiento migratorio. También, pueden diferenciarse por expansión mediada por células T en respuesta a ciertos parásitos, es decir, son inducibles, transitorias (con una vida media de 2 semanas), y dependientes de las células T. Su proliferación es inducida por interleucina 3 (IL-3) *in vitro*. Contienen pocos gránulos de tamaño variable que se caracterizan por la presencia de quimasa (proteasa de ratón, mMCP -1 y -2). También, contienen sulfato de condroitina, bajos niveles de histamina y heparina, además de producir gran cantidad de cisteinil leucotrienos (Bankova et al., 2014; Dwyer et al., 2016; Elieh Ali Komi et al., 2020; Gurish & Austen, 2012; Gurish & Boyce, 2006; Jiménez et al., 2021; Li et al., 2018).

Las CTMCs se encuentran alrededor de las vénulas y terminaciones nerviosas de la mayoría de los tejidos conectivos (piel, lengua, tráquea, esófago, tejido adiposo, submucosa intestinal, cavidad peritoneal y cavidad pleural). Son constitutivas (independientes de células T) y poseen un tamaño promedio de entre 17 - 22 μm . Surgen durante la embriogénesis de progenitores derivados del hígado fetal y el saco vitelino y tienen un comportamiento no migratorio. Se mantienen por longevidad o auto-renovación, más que por reemplazo de progenitores de CCs derivados de la médula ósea. Su proliferación es independiente de IL-3 y solo ocurre en presencia sinérgica de IL-3 con IL-4 en ratón o IL-3 con el factor de células troncales (SCF) en rata. Poseen muchos gránulos de menor tamaño que se identifican por la presencia de triptasa (mMCP -6 y -7), quimasa (mMCP -3 y -4) elastasa (mMCP -5) y carboxipeptidasa A3 (CPA3). Además, poseen un mayor contenido de histamina, producen altos niveles de prostaglandina D2 y contienen heparina en lugar de sulfato de condroitina. Las CCs derivadas de peritoneo (PMCs) constituyen un ejemplo de CTMCs (Bankova et al., 2014; Dwyer et al., 2016; Elieh Ali Komi et al., 2020; Gurish & Austen, 2012; Gurish & Boyce, 2006; Jiménez et al., 2021; Li et al., 2018).

1.1.3 Contenido granular

Llenas con una gran variedad de compuestos preformados, las CCs liberan esos mediadores al entorno extracelular y dependiendo del estímulo, las CCs pueden sintetizar *de novo* muchos compuestos bioactivos. No obstante, muchas de las funciones fisiológicas y patológicas de las CCs están asociadas no solo con su abundancia en los tejidos, sino también con la extensión, naturaleza y las acciones biológicas de los mediadores liberados (A. Gilfillan et al., 2011; Wernersson & Pejler, 2014).

Por su forma de síntesis, almacenamiento y secreción, los mediadores se dividen en dos categorías: los mediadores preformados y los mediadores recién sintetizados (*de novo*). De aquellos llamados preformados (tabla 1), los gránulos secretorios contienen proteínas lisosomales (como la β -hexosaminidasa), aminas biogénicas (como la histamina y la serotonina), algunos glicosaminoglicanos (como la heparina y los sulfatos de condroitina) y diversas proteasas específicas de CCs, que incluyen: triptasas, quimasas y CPA3. A su vez, especies de proteoglicanos de serglicina son componentes granulares principales de células maduras que, además, permiten la tinción fuerte típica con diversos colorantes catiónicos. Sin embargo, también contienen varias proteasas no exclusivas de las CCs (Chelombitko et al., 2020; Marshall, 2004; Moon et al., 2014; Wernersson & Pejler, 2014).

El segundo grupo de mediadores incluye: metabolitos del AA (como prostaglandinas y leucotrienos), citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que se sintetizan *de novo* y se liberan sólo tras la estimulación de CCs en lugar de almacenarse (Chelombitko et al., 2020; Marshall, 2004; Moon et al., 2014; Wernersson & Pejler, 2014). Varios de esos compuestos provocan una reacción inmediata tipo alérgica (figura 2), caracterizada por vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular, regulación positiva de las moléculas de adhesión, broncoconstricción y reclutamiento de células inflamatorias. Si además, la estimulación de las CCs se prolonga o es constante, induce una reacción alérgica de fase tardía que puede

contribuir a estados de inflamación crónica (Jiménez et al., 2021; Kraft & Kinet, 2007).

Tabla 1: Principales mediadores almacenados en gránulos de células cebadas

Mediador	Principales características
<i>Enzimas lisosomales</i>	Probable función en procesos de degradación lisosomal normal.
β-hexosaminidasa	<ul style="list-style-type: none"> • Involucrada en el recambio de carbohidratos y degradación de gangliósidos. • Usada de manera rutinaria como marcador para las respuestas de desgranulación.
β -glucoronidasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, y β- d- galactosidasa	Involucradas en el recambio de carbohidratos.
Arilsulfatasa A	Involucrada en el recambio de gluco-esfingolípidos.
Catepsina B, C y L	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasas de cisteína. • La B y L involucradas en procesamiento de pro-triptasa. • La C involucrada en procesamiento pro-quimasa.
Catepsina D y E	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasas de ácido aspártico. • La D: probable participación en procesos de degradación lisosomal normal. • La E: involucrada en procesamiento de pro-CPA3.
<i>Aminas biogénicas</i>	Neurotransmisores con rol potencial en la señalización mediada por CCs a las terminales nerviosas.
Histamina	<ul style="list-style-type: none"> • Presentes en todos los subtipos de CCs en todas las especies. • Induce broncoconstricción, vasodilatación y aumento en la permeabilidad vascular.
Serotonina	Altos niveles en CCs humanas y de roedor.
Dopamina	Bajos niveles, ausente en CCs humanas.
Poliaminas (ej. Espermidina y espermina)	<ul style="list-style-type: none"> • Regula la ultraestructura granular y almacenamiento de histamina, serotonina y β-hexosaminidasa.
<i>Citocinas</i>	
TNF	<ul style="list-style-type: none"> • Primer citocina almacenada en gránulos de CCs demostrada • Actividad pro-inflamatoria. • Puede contribuir al reclutamiento de leucocitos en sitios de inflamación (Mukai et al., 2018).
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Liberada por el entrecruzamiento del receptor de IgE o en respuesta a ionóforos de calcio (Mukai et al., 2018). • Rol crítico en polarización de células TH2 dirigida por CCs y desarrollo de reacciones alérgicas (Mukai et al., 2018). • Se sabe que influye en la función, diferenciación y crecimiento de CCs (Mukai et al., 2018).
<i>Factores de crecimiento</i>	
bFGF	<ul style="list-style-type: none"> • Parece estar asociado con heparina.

	<ul style="list-style-type: none"> • Implicado en efectos pro-angiogénicos de CCs.
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> • Liberado por el entrecruzamiento del receptor de IgE. • Implicado en efectos pro-angiogénicos de CCs y de permeabilidad vascular. • Las CCs pueden contenerlo constitutivamente preformado como un factor de unión a heparina (Mukai et al., 2018).
TGF- β1	<ul style="list-style-type: none"> • Liberado durante la desgranulación. • Implicado en efectos pro-fibróticos, anti-inflamatorios de CCs, angiogénesis y reparación tisular. • Puede suprimir la actividad de diversos leucocitos incluida la de las CCs y reducir los niveles de expresión del FcϵRI en su superficie (Mukai et al., 2018). • Inhibe la proliferación de cultivos de BMMCs de ratón y PMCs de ratón (Mukai et al., 2018).
NGF	<ul style="list-style-type: none"> • Liberado por el entrecruzamiento del receptor de IgE. • Implicado en interacciones potenciales entre CCs y terminales nerviosas periféricas. • Sus efectos regulan el desarrollo, crecimiento, supervivencia y función de neuronas centrales y periféricas (Mukai et al., 2018). • Promueve el desarrollo de CCs <i>in vivo</i> (Mukai et al., 2018).
SCF	<ul style="list-style-type: none"> • Presente en el citoplasma. • No liberado por el entrecruzamiento del receptor de IgE. • Principal factor de crecimiento de CCs. • Esencial para la diferenciación, crecimiento, y supervivencia normal de CCs (Mukai et al., 2018).
Proteoglicanos	
	Importantes en la maduración de gránulos secretores.
Serglicina	<ul style="list-style-type: none"> • Expresión alta en CCs, pero también se expresa en células hematopoyéticas y endoteliales. • Rol principal en promover el almacenamiento de proteasas y aminos. • Considerado para la tinción metacromática de CCs. • Esencial para la formación de gránulos de núcleo denso.
Heparina y sulfato de condroitina	<ul style="list-style-type: none"> • Importantes para el almacenamiento de proteasas y aminos. • Forman una matriz de gel aniónico que empaqueta los mediadores (Moon et al., 2014).
Proteasas específicas de CCs Remodelan el tejido y reclutan células efectoras.	
Triptasas y quimasas	<ul style="list-style-type: none"> • Proteasas de serina específicas de CCs (Craig & Schwartz, 1989). • Pueden tener funciones ya sea de protección o perjudiciales en entornos inflamatorios.
CPA3	<ul style="list-style-type: none"> • Metaloproteinasas altamente expresadas en CCs con baja expresión en basófilos. • Esencial para protección contra ciertas toxinas.
Proteasas no específicas de CCs	
Catepsina G, MMP9, Caspasa activa 3, ADAMTS5, Granzima B, Renina.	
Proteínas asociadas a membrana granular	
VAMP 2, 3, 7 y 8, Syntaxina 3, Sinaptotigmina II y III, MUNC 18-2 y 13-4, SCAMP 1 y 2, CD63, RAB 3D, 5, 7, 9A, 19, 27A, 27B, 42 y 43, ILC3-II, MHC II.	

ADAMTS5: desintegrina y metaloproteínasa con trombospondina tipo 1 motivo 5, bFGF: Factor básico de crecimiento de fibroblastos, BMMCs: células cebadas derivadas de la médula ósea, CD63: tetraspanina, CPA3: carboxipeptidasa A3, IL: interleucina, ILC3-II: proteína relacionada con autofagia, MHC: complejo principal de histocompatibilidad, MMP9: metalopeptidasa de matriz 9, MUNC: proteína de unión a sintaxina, NGF: factor de crecimiento nervioso, PMCs: células cebadas derivadas de peritoneo, RAB: proteína GTPasa que regula el tráfico de membrana, SCAMP: proteína accesoria en eventos de fusión de gránulos mediados por SNARE, SCF: factor de células troncales, TGF- β : factor de crecimiento transformante tipo- β , TNF: factor de necrosis tumoral, VAMP: proteína de membrana asociada a vesículas, VEGF: factor de crecimiento derivado del endotelio vascular. Modificada de: Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: Armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 478–494.

1.2 Activación de células cebadas dependiente del Fc ϵ RI

La activación de las CCs puede ocurrir en respuesta a diversos estímulos tanto exógenos como endógenos. No obstante, la activación dependiente del receptor Fc ϵ RI es el mecanismo más estudiado e imita la exposición fisiológica a un Ag o alérgeno (Chen et al., 2017; Wernersson & Pejler, 2014). En ese mecanismo, Ags multivalentes interaccionan con monómeros de IgE previamente unida a su receptor de alta afinidad en la superficie celular (figura 2), lo que provoca la agregación de receptores y el inicio de señalización intracelular (Galli et al., 2005).

La unión de la IgE a su receptor de alta afinidad en la superficie de las CCs, se ha considerado como un evento pasivo llamado “sensibilización” y precede al entrecruzamiento del receptor por el Ag y al desarrollo de la alergia clínica (Kawakami & Kitaura, 2005; Wagner et al., 2009). Aunque se requiere de la agregación del Fc ϵ RI inducida por el Ag para provocar los eventos de señalización necesarios para la liberación completa de mediadores inflamatorios a través de un proceso denominado desgranulación anafiláctica (A. Gilfillan et al., 2011), la ocupación del Fc ϵ RI con la IgE en su forma monomérica (mIgE), en ausencia de Ag, también provoca respuestas en las CCs (figura 2). Entre ellas, induce la producción autocrina de citocinas, quimiotaxis de CCs, prevención de la apoptosis y mejora su supervivencia aún en ausencia de factores de crecimiento (A. Gilfillan et al., 2011; Kraft & Kinetic, 2007).

Una vez activadas, las CCs pueden responder de manera diferencial en términos de la cantidad, la cinética y los tipos de mediadores liberados. Por ejemplo, un estímulo de alta intensidad provoca la exocitosis masiva y extendida de mediadores

preformados y recién sintetizados que inducen una reacción sistémica (figura 2), mientras que un estímulo de baja intensidad o la estimulación independiente del FcεRI, aunque provocan la liberación selectiva de algunos compuestos preformados y de mediadores recién sintetizados, no provocan desgranulación anafiláctica (Frossi et al., 2017).

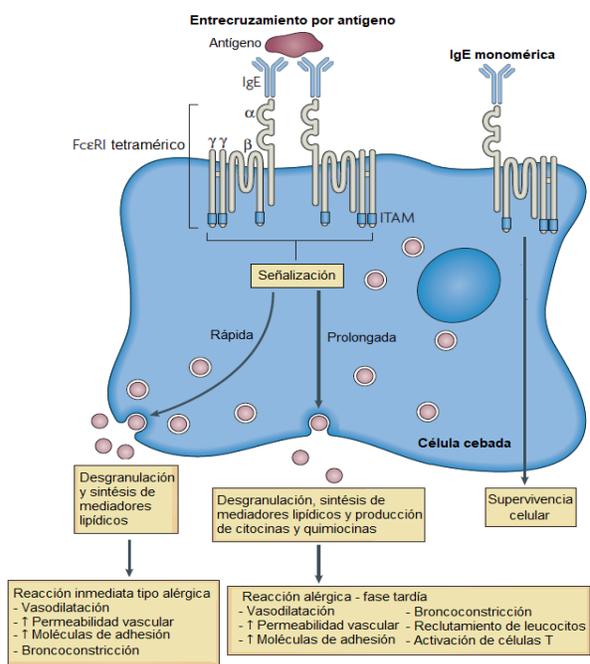


Figura 2. Estructura del FcεRI y efectos biológicos de su activación. El complejo que induce la desgranulación anafiláctica se compone de por lo menos, dos heterotetrámeros entrecruzados por el complejo IgE/Ag. Cada heterotetrámero está formado por una subunidad α, una β y dos γ. Las subunidades β y γ contienen sitios de fosforilación llamados motivos de activación basados en inmunotirosina (ITAMs). En cuestión de minutos, se activan vías de señalización que llevan a la secreción rápida de mediadores preformados, responsables de las reacciones alérgicas inmediatas. Tras una estimulación prolongada del receptor, se induce la fase tardía de la reacción alérgica, que está mediada por la producción de citocinas y quimiocinas. De esta forma, si la estimulación es de larga duración o se repite varias veces, las células cebadas pueden contribuir a la inflamación crónica. Los efectos independientes del antígeno están mediados por la unión de la IgE monomérica al FcεRI y

favorecen la supervivencia celular. Adaptada de: Kraft, S., & Kinet, J. P. (2007). New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 7(5).

1.3 Receptor FcεRI

El FcεRI es un receptor multimérico de superficie celular que reconoce con gran afinidad al fragmento cristalizante (Fc) de la IgE ($K_d = 10^{-9} - 10^{-10}$ M) (Kraft & Kinet, 2007; Turner & Kinet, 1999). Es miembro de la superfamilia de receptores multicadena de reconocimiento inmunitario (MIRRs) (Keegan & Paul, 1992), y se expresa como un complejo tetramérico (figura 2). Está compuesto por una subunidad α (que atraviesa una vez la membrana plasmática y contiene un dominio extracelular que forma el sitio de unión a la IgE); una subunidad β (que atraviesa cuatro veces la membrana plasmática) y dos subunidades γ conectadas por un puente disulfuro (Kraft & Kinet, 2007). Las cadenas β y γ no participan en la unión a

ligando, pero contienen motivos de activación basados en inmunotirosina (ITAMs) que inician rutas de señalización río abajo y amplifican la señal (A. M. Gilfillan & Tkaczyk, 2006).

1.3.1 Vías de señalización activadas por la estimulación del receptor FcεRI en células cebadas

El sistema de señalización del FcεRI descrito en las CCs puede apreciarse en la figura 3. Los eventos iniciales de señalización involucran la coalescencia de los receptores agregados por complejos IgE/Ag en microdominios especializados de la membrana plasmática conocidos como balsas lipídicas (A. M. Gilfillan & Tkaczyk, 2006). El FcεRI como otros MIRRs, carece de actividad enzimática intrínseca por lo tanto, tienen que reclutar varios elementos de la transducción como las cinasas de tirosina de la familia Src, Lyn y Fyn, que participan en la activación del receptor y en la fosforilación de otras proteínas asociadas a él (Abbas et al., 2018; Berridge, 2014a; A. M. Gilfillan & Tkaczyk, 2006; Kraft & Kinet, 2007). Esas cinasas, (principalmente Lyn), fosforilan los ITAMs de las subunidades β y γ del receptor, lo que ocasiona que la cinasa Syk se reclute y se active por autofosforilación. Una vez activa, Syk fosforila en tirosinas a las moléculas adaptadoras transmembranales LAT (adaptador para la activación de células T) y NTAL (adaptador para la activación de células distintas a los linfocitos T) que sirven de andamio para generar complejos multi-proteicos que dirigen la señal del receptor hacia varias vías secundarias (A. M. Gilfillan & Tkaczyk, 2006; Kraft & Kinet, 2007; Siraganian et al., 2011; Turner & Kinet, 1999).

El reclutamiento de la fosfolipasa Cγ (PLCγ) al complejo de LAT lleva a la generación de diacil-glicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) que, activarán respectivamente a la proteína cinasa C (PKC) y, al receptor de IP₃ (IP₃R) que se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico (A. M. Gilfillan & Tkaczyk, 2006). Lo anterior, ocasionará la salida de Ca²⁺ del retículo hacia el citoplasma y la apertura de canales de Ca²⁺ activados por depósitos o SOCs expresados en la membrana celular que serán activados en respuesta al vaciamiento de las pozas

intracelulares (Putney et al., 2001). Por otro lado, en las CCs también se ha descrito una vía de entrada de Ca^{2+} que es activada de manera independiente al vaciamiento de las pozas intracelulares y los canales de membrana involucrados en ese mecanismo se les conoce como canales activados por receptor o ROCs, como puede apreciarse en la figura 3 (Suzuki et al., 2012). Por lo tanto, la desgranulación anafiláctica ocurre tras la activación de la $\text{PLC}\gamma$, la activación de la PKC y el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A. M. Gilfillan & Tkaczyk, 2006).

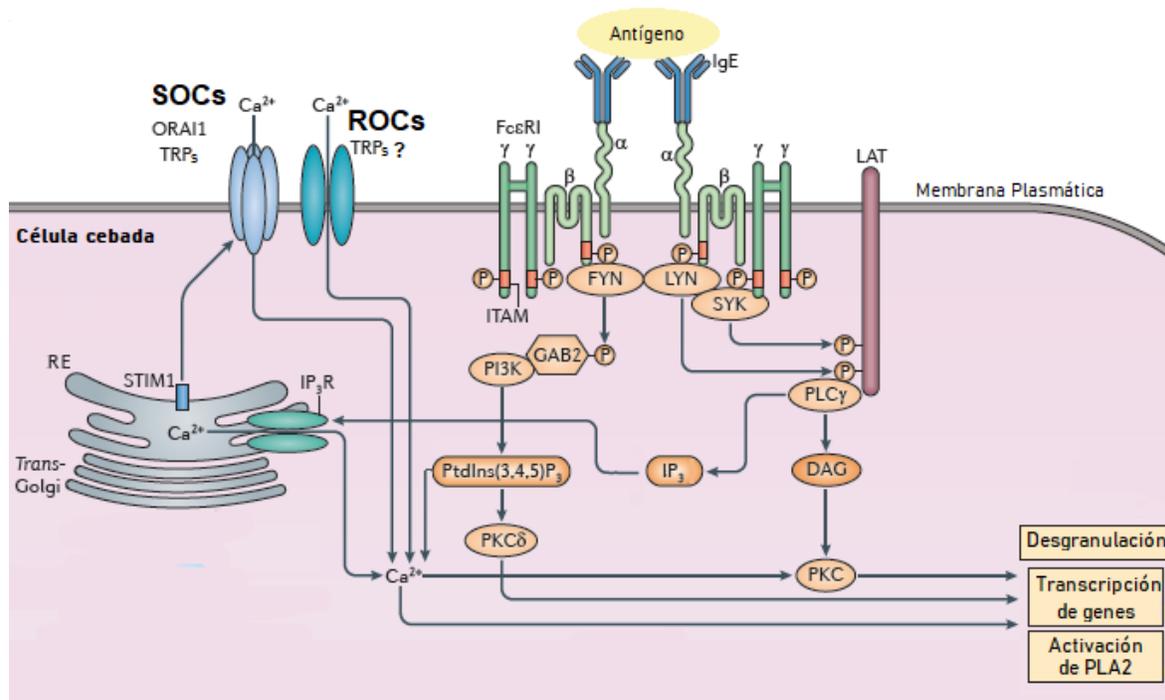


Figura 3 Sistema de señalización activado por la estimulación del receptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ y los mecanismos de entrada de calcio en células cebadas. La transducción de señales es iniciada por las cinasas de tirosinas Lyn, Syk y Fyn, las cuales, fosforilan diferentes elementos que promueven el reclutamiento de componentes de la señalización de diferentes vías que activan a la fosfolipasa A2 (PLA_2), la desgranulación y la transcripción génica. A su vez, la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares ocurre cuando el IP_3 se une a sus receptores en el retículo endoplásmico (RE) permitiendo la salida de Ca^{2+} al citosol. El sensor de Ca^{2+} del RE, STIM1 detecta el vaciamiento de Ca^{2+} del RE y media la apertura de los canales SOCs como ORAI1. En esa entrada de Ca^{2+} , se ha encontrado evidencia de la participación de algunos canales TRPs. Por otro lado, la activación del receptor induce la entrada de Ca^{2+} de manera independiente al vaciamiento de las pozas intracelulares (ROCE), donde los canales TRPs también podrían participar. Modificada de: Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: Armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 478–494.

El Ca^{2+} también participa en la producción de citocinas a través de la vía Ca^{2+} /calcineurina/NFAT. El Ca^{2+} citosólico interactúa con la proteína de unión a Ca^{2+} , calmodulina (CaM), lo que da como resultado la activación de enzimas

dependientes de CaM, incluyendo a la fosfatasa calcineurina (CaN) y a la cinasa II dependiente de Ca²⁺/CaM (CaMKII). La CaN, también conocida como proteína fosfatasa 2B (PP2B), desfosforila múltiples fosfoserinas en NFAT, lo que lleva a su translocación nuclear y activación (Berridge, 2014d; Hogan et al., 2003).

Por otro lado, una vía complementaria iniciada por el FcεRI es mediada por la cinasa Fyn y también participa en la desgranulación y en la producción de citocinas (figura 3). En esa vía, Fyn fosforila al adaptador citosólico GAB2, que conduce al reclutamiento y activación del fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI₃K), posiblemente coordinado por el adaptador NTAL. PI₃K, fosforila fosfoinosítidos asociados a la membrana plasmática en la posición 3', proporcionando así, un sitio de acoplamiento que recluta y activa a cinasas como BTK y PDK1, las cuales, participan en el mantenimiento de la señal de Ca²⁺ (al activar a la PLCγ en cooperación con Syk), y en la activación de la PKCδ respectivamente (Berridge, 2014a; A. M. Gilfillan & Tkaczyk, 2006; Kraft & Kinet, 2007).

1.4 Mecanismos de desgranulación en células cebadas

Si bien todas las células eucariotas son capaces de transportar y llevar a cabo la exocitosis de proteínas por la vía secretora constitutiva, solo algunas células secretoras especializadas son capaces de realizar “*exocitosis regulada o desgranulación*” (Blank, 2011). En las CCs, existen varios mecanismos de secreción que se han estudiado con distinta profundidad.

La liberación regulada de péptidos, aminas, lípidos, e incluso algunos gases depende de diversas vías moleculares. Una de ellas, desencadena la liberación de grandes vesículas de núcleo denso (gránulos), a través de un proceso secretor especializado denominado exocitosis regulada o desgranulación; otras vías dependen de la producción *de novo* de mediadores y un complejo tráfico y reciclaje de vesículas desde el retículo endoplásmico (RE) que incluyen a las vías de secreción constitutiva, exosómica y endosómica, mientras que otras vías secretoras como la difusión de gases y mediadores lipídicos no dependen del tráfico vesicular (Blank, 2011; Blank et al., 2014; Moon et al., 2014).

La desgranulación implica eventos de fusión gránulo-gránulo y fusión de gránulos con la membrana plasmática. Esos eventos, dependen de la translocación de los gránulos a lo largo de microtúbulos desde el interior de la célula hacia la membrana plasmática. Así como también de la interacción entre varias proteínas SNAREs (receptores de proteínas de fijación al factor sensible a N-etilmaleimida soluble) y de varias proteínas accesorias (como la complexina II, la GTPasa de la familia RAB y las sinaptotagminas) que actúan como sensores de Ca^{2+} y son críticas en el proceso de exocitosis (Blank et al., 2002; Wernersson & Pejler, 2014). Por lo tanto, la movilización de Ca^{2+} es esencial para la desgranulación y los aumentos transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$ pueden activar o amplificar ese proceso (I. Ashmole & Bradding, 2013; Fahrner et al., 2013; Suzuki et al., 2012).

Otras formas de desgranulación se han descrito en las CCs, como la “*exocitosis fragmentaria o picemal*” que se caracteriza por la liberación selectiva de porciones del contenido granular en ausencia de eventos de fusión gránulo - gránulo o gránulo - membrana plasmática observables. Además, el vaciado del granulo secretor ocurre de manera gradual durante períodos de tiempo más largos (Blank et al., 2014; Frossi et al., 2017; Moon et al., 2014). A su vez, las CCs pueden secretar diversidad de citocinas y quimiocinas por otras vías que incluyen la “*exocitosis constitutiva*” por ejemplo. Ese tipo de exocitosis, ocurre a través de pequeños portadores vesiculares por secreción exosomal o por reciclaje de endosomas, se produce en ausencia de estímulos discernibles y puede ocurrir a lo largo de toda la vida útil de una célula (Tae Chul Moon et al., 2014).

1.5 Señalización por calcio en células cebadas

La señalización por Ca^{2+} mantiene funciones fisiológicas de las CCs como la expresión de genes, proliferación, apoptosis, secreción y re-arreglos del citoesqueleto necesarios para la migración, adhesión y quimiotaxis (Feske et al., 2015; Freichel et al., 2012; Ma & Beaven, 2009). A su vez, todas esas funciones efectoras tras la estimulación de las CCs dependen en distintos grados de un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, y una actividad en particular puede requerir una distribución espacial y temporal específica de la señal de Ca^{2+} . Por lo tanto, el mecanismo de la

señalización del Ca^{2+} comienza con un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que se logra por la presencia de canales iónicos permeables al Ca^{2+} tanto en la membrana celular como en depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Ma & Beaven, 2009; Suzuki et al., 2012).

1.5.1 Mecanismos de entrada de calcio extracelular en células cebadas

En la mayoría de las células, incluidas las CCs, la concentración de Ca^{2+} citosólico se mantiene en niveles bajos (100-150 nM) en el reposo. Sin embargo, tras la estimulación, ocurre un aumento que puede llevar las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta 1 μM (Berridge, 2014b; Blank et al., 2014; Ma & Beaven, 2009; Suzuki et al., 2012). La movilización de Ca^{2+} al citoplasma puede provenir de dos fuentes: de su liberación transitoria desde depósitos intracelulares (principalmente el RE), o de su entrada a través de canales expresados en la membrana plasmática. Ambos procesos, ocurren a menudo de forma simultánea o secuencial (Feske et al., 2015; Putney et al., 2001).

A diferencia de las células excitables, cuyo aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurre principalmente por canales de Ca^{2+} operados por voltaje, la vía más comúnmente observada esencialmente en todas las células no excitables, es conocida como entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE). Concepto propuesto por Putney en 1986, analizando precisamente el proceso de desgranulación de las CCs (Chang, 2006; Chen et al., 2017; Ma & Beaven, 2009). En ese mecanismo de entrada de Ca^{2+} , la depleción de los depósitos intracelulares ocurre debido a la unión del IP_3 a su receptor, IP_3R (que es un canal de liberación Ca^{2+} localizado en la superficie del RE, ver figura 3 y 4), resultando en el aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Asimismo, cuando los depósitos de Ca^{2+} se vacían, la molécula de interacción estromal 1 (STIM1, que también se encuentra en la membrana del RE), actúa como un sensor de Ca^{2+} (Berridge, 2014c; Chang, 2006; Feske et al., 2015; Putney et al., 2001; Suzuki et al., 2012).

Tras el agotamiento de las reservas de Ca^{2+} en el RE, STIM1 detecta el estado de los depósitos de Ca^{2+} en el lumen del RE a través de un dominio de unión a Ca^{2+} (mano EF) localizado en su extremo amino terminal (N-terminal). El Ca^{2+} se disocia del dominio de mano EF en la luz del RE, lo que provoca cambios conformacionales

primero, en el extremo N-terminal y luego en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) localizado en el citoplasma de las CCs. Esos cambios estructurales exponen dominios que permiten la oligomerización y la translocación de STIM1 a las regiones del RE que están cerca a la membrana plasmática donde forma grandes grupos en los que recluta a canales de Ca^{2+} operados por depósitos (SOCs) como a ORAI1, induciendo su apretura. Lo anterior, gracias a que el extremo C-terminal de STIM1 contiene 3 dominios de dimerización de bobina en espiral y un dominio rico en lisina que median la interacción de STIM1 con los SOCs y fosfolípidos de membrana y, permiten la translocación de varias moléculas de STIM1 a las uniones RE-membrana plasmática después de la estimulación celular y el agotamiento de Ca^{2+} de los depósitos, ver figura 3 y 4. A su vez, la unión de STIM1 a ORAI1 está mediada por un dominio de activación SOCE (Feske et al., 2015).

El otro mecanismo se caracteriza por la entrada de Ca^{2+} extracelular que, puede ocurrir por la activación de receptores de membrana y por una variedad de segundos mensajeros. En esa vía, la entrada de Ca^{2+} es independiente del agotamiento de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares (mecanismo no-SOCE), y es conocida como entrada de Ca^{2+} operada por receptor (ROCE). En ese mecanismo, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurre por canales catiónicos no específicos llamados de manera general, canales activados por receptor (ROCs), como puede apreciarse en la figura 3 y 4 (Hoth et al., 1993; Putney et al., 2001; Suzuki et al., 2012).

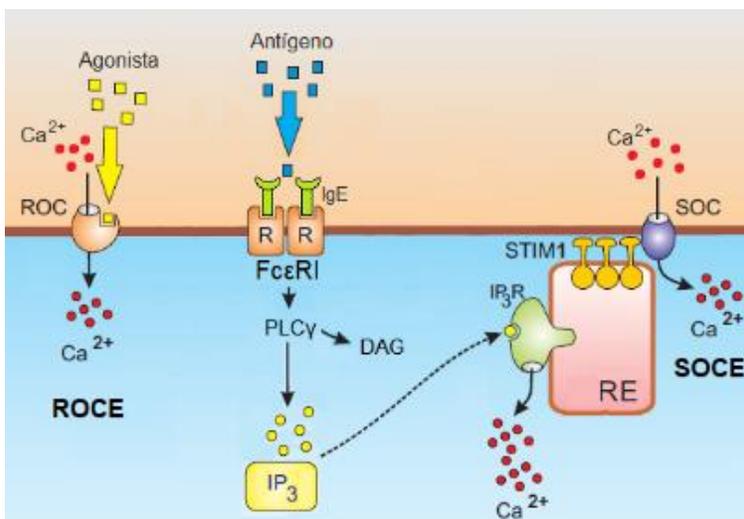


Figura 4. Mecanismos de entrada de Ca^{2+} a las células cebadas. El mecanismo más directo que provoca el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurre por la activación de canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCs) en la membrana plasmática, en el cual, un agonista se une directamente al canal induciendo la entrada de Ca^{2+} extracelular (mecanismo ROCE). Por otra parte, la activación del receptor FcεRI por el antígeno provoca la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares (SOCE). Esto, a

través de la producción de IP_3 (por la $PLC\gamma$) y la unión a su receptor (IP_3R) en la membrana del retículo endoplásmico (RE), que resulta en la liberación de Ca^{2+} . La molécula de interacción estromal 1 (STIM1), sensa la depleción de Ca^{2+} del RE, lo que provoca su translocación a regiones cercanas a la membrana plasmática donde activa canales de Ca^{2+} operados por depósitos (SOCs). La consecuencia es la entrada de Ca^{2+} extracelular en un mecanismo SOCE. Modificada de: Berridge, M. J. (2014c). Module 3: Ion Channels. Cell Signalling Biology, 6, csb0001003.

Ambas vías de entrada de Ca^{2+} (SOCE y ROCE), parecen ser independientes de voltaje y proporcionan una mayor entrada de Ca^{2+} en potenciales de membrana hiperpolarizantes (Hoth et al., 1993).

Una vez que el Ca^{2+} ha cumplido su función de señalización, existen bombas de Ca^{2+} e intercambiadores que lo eliminan del citoplasma (figura 7b), ya sea expulsándolo de la célula o devolviéndolo al interior de los depósitos intracelulares (Berridge, 2014b). El mecanismo de recaptura de Ca^{2+} al RE es un proceso dependiente de ATP, mediado por la bomba ATP-asa de Ca^{2+} del retículo sarco / endoplásmico (SERCA). El compuesto tapsigargina, bloquea la recaptura de Ca^{2+} al inhibir específicamente a SERCA y al hacerlo desenmascara una pérdida o "fuga" espontánea de Ca^{2+} del grupo de canales sensible a IP_3 sin estimular la hidrólisis del fosfoinosítido. En consecuencia, la depleción de los depósitos intracelulares (por tapsigargina o IP_3) inevitablemente da como resultado la entrada de Ca^{2+} a la célula al activar SOCs en la membrana plasmática por un mecanismo SOCE (Ma & Beaven, 2009).

1.5.2 Fuerza impulsora para la entrada de calcio y regulación del potencial de membrana

Dado que el influjo de cationes divalentes, especialmente el Ca^{2+} , requiere un potencial de membrana negativo (Feske et al., 2019), la fuerza eléctrica impulsora para la entrada de Ca^{2+} es proporcionada por un potencial de membrana celular hiperpolarizado, que, se mantiene por la actividad de los canales de K^+ (Lam et al., 2008). Una de las consecuencias del influjo de Ca^{2+} posterior a la activación del receptor es la despolarización de la membrana, que, si no se controla, limita aún más el influjo del Ca^{2+} al eliminar el gradiente electroquímico favorable para impulsar la entrada de Ca^{2+} (Feske et al., 2015). En consecuencia, la despolarización de la membrana celular disminuye la entrada de Ca^{2+} y la posterior desgranulación de las

CCs (Lam et al., 2008). Por lo tanto, las CCs y otras células no excitables requieren de canales de K^+ no dependientes de voltaje que, al expulsar el K^+ , mantienen un potencial de membrana hiperpolarizado, crítico para mantener el gradiente de Ca^{2+} , ver figura 5 (Feske et al., 2015).

En las CCs, el canal de K^+ de conductancia intermedia $KCa3.1$, se activa por la unión Ca^{2+} / CaM después de la estimulación dependiente del $Fc\epsilon RI$. La CaM, está constitutivamente asociada al extremo C-terminal del canal $KCa3.1$, que tras la unión del Ca^{2+} a la CaM provoca la apertura del canal. La actividad del $KCa3.1$, mantiene la fuerza eléctrica impulsora para el influjo de Ca^{2+} a través de canales Ca^{2+} que rectifican fuertemente hacia adentro y, por lo tanto, conducen corrientes más grandes a potenciales de membrana negativos (Duffy et al., 2015; Feske et al., 2015, 2019; Freichel et al., 2012).

Por otra parte, el canal receptor de potencial transitorio de la subfamilia melastatina miembro 4 (TRPM4, figura 7b), es un canal catiónico monovalente activado por el influjo de Ca^{2+} posterior a la estimulación del $Fc\epsilon RI$ por el Ag. Es altamente permeable al sodio (Na^+) y, cuando se activa despolariza la membrana de las CCs, limitando así la entrada de Ca^{2+} (Feske et al., 2015; Ma & Beaven, 2009).

1.6 Canales receptores de potencial transitorio

A pesar de que no se ha logrado la identificación molecular de todos los canales que median la SOCE, varios miembros de la familia de canales receptores de potencial transitorio (TRPs) muestran propiedades similares a otros SOCs que han sido definidas mediante electrofisiología (Spassova et al., 2004). Además, existe evidencia que indica que una entrada inicial de Ca^{2+} no-SOCE es necesaria para la activación completa de las CCs (Sanchez-Miranda et al., 2010). Canales de la familia de los TRPs (como el TRP de tipo canónico 1, TRPC1), han estado involucrados en la entrada de Ca^{2+} tanto SOCE como no-SOCE en CCs (Tshori & Razin, 2010).

La superfamilia multi-génica de TRPs, codifica para proteínas integrales de membrana que funcionan como canales iónicos no selectivos y sensores polimodales (Gees et al., 2010; Nilius & Owsianik, 2011). Se compone de 28 miembros en mamíferos (27 en humanos), que regulan el influjo de cationes mono y divalentes. Generan despolarización activando procesos celulares dependientes de voltaje y a la vez, son críticos en la inducción de actividades metabólicas celulares (Smith & Nilius, 2013).

Se dividen en 6 subgrupos basados en secuencias similares de aminoácidos y arquitectura de dominio que incluyen los subtipos canónico o clásico (TRPC), vaniloide (TRPV), melastatina (TRPM), policistina (TRPP), mucolipina (TRPML), y anquirina (TRPA). Responden a diferentes estímulos físicos, químicos y mecánicos, por lo que su expresión en células nerviosas es alta, en donde tienen un papel en la electrogénesis (figura 5). Sin embargo, los TRPs se expresan en casi todas las células, tanto excitables como no excitables en diferentes tejidos y se pueden encontrar en la mayoría de las membranas celulares, excepto en la membrana nuclear y mitocondrial. Las células del sistema inmunitario innato y adaptativo también expresan varios canales TRP, en donde son parte de vías celulares relacionadas con la síntesis de muchos mediadores inflamatorios y contribuyen a la regulación de la señal Ca^{2+} como puede apreciarse en la figura 5 (Duitama et al., 2020; Feske et al., 2015; Nilius & Owsianik, 2011).

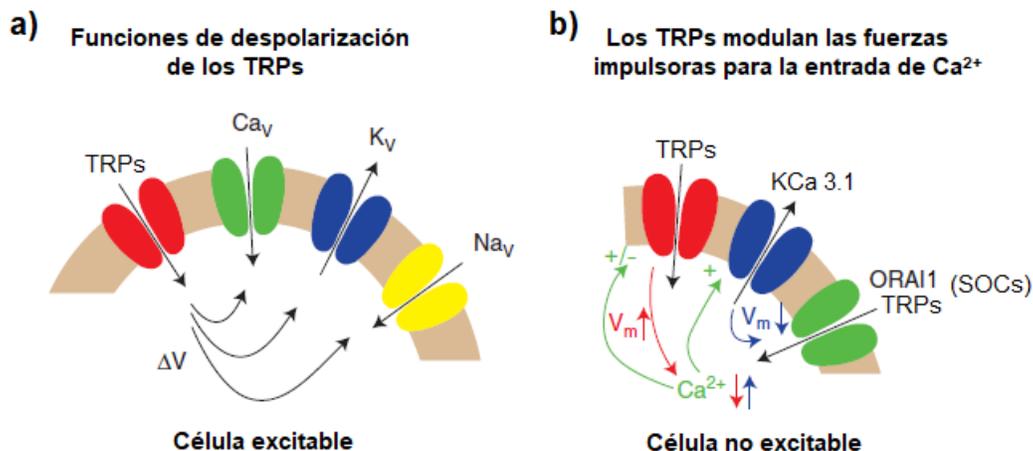


Figura 5. Diferencias en la función de los TRPs en células excitables y no excitables. Los canales TRP despolarizan a las células excitables y modulan la fuerza impulsora para la entrada de Ca^{2+} en células no excitables. **a)** La despolarización (ΔV) de células excitables tras la apertura de los

TRPs, regula la apertura de canales de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ dependientes de voltaje (en color verde, azul y amarillo respectivamente). **b)** La despolarización de la membrana ($V_m \uparrow$: voltajes de membrana más positivos), provocada por la apertura de los canales TRPs (en color rojo) en células no excitables como las CCs, resulta en una entrada de Ca^{2+} reducida (flecha roja) a través de los SOC_s ORA11 y otros TRPs (en color verde). En cambio, la hiperpolarización de la membrana ($V_m \downarrow$: voltajes de membrana más negativos), dada por los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (KCa3.1 en CCs, en color azul), ocasiona un aumento en la entrada de Ca^{2+} (flecha azul). Ese influjo de Ca^{2+} , posteriormente modula la función de los TRPs y los canales de K^+ para ajustar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (flechas verdes). Adaptada de: Gees, M., Colsoul, B., & Nilius, B. (2010). The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca^{2+} Signaling. 1–31.

1.6.1 Estructura de los TRPs y mecanismo de apertura

Todos los TRPs son similares estructuralmente (figura 6). Se componen de un homotetrámero donde cada subunidad posee seis segmentos transmembranales (ST). Contienen largos dominios N-terminal y C-terminal orientados hacia el citosol, los cuales, modulan su función ya que se conforman de residuos y motivos reguladores únicos para cada subfamilia (Duitama et al., 2020; Hellmich & Gaudet, 2014).

Los ST1 al ST4 forman un dominio similar al sensor de voltaje (VSLD). Aunque muchos TRPs están débilmente modulados por el voltaje, el VSLD no puede considerarse como el determinante principal para la sensibilidad al voltaje en la mayoría de los TRPs. En cambio, puede servir como un dominio de unión a ligando para muchos de esos canales. El ST5 y ST6, se pliegan para delinear el poro conductor de iones. Su apertura está influenciada por módulos detectores de agonistas en otras regiones de la proteína que forman un filtro de selectividad catiónica y la compuerta de activación del canal (Xiaoli Zhang et al., 2018). Las repeticiones de anquirina son uno de los motivos más prevalentes que se asocian principalmente con funciones de interacción proteína - proteína y varían en número para cada subfamilia (Hellmich & Gaudet, 2014).

En vista de que la mayoría de esos canales muestran poca dependencia de voltaje, su apertura ocurre principalmente por mecanismos de fosforilación o modificación química (como la oxidación y la glutationilación) de varios residuos de aminoácidos (Kashio & Tominaga, 2017; Shunichi et al., 2014; Taberner et al., 2016). Sin

embargo, el mecanismo molecular que subyace a la activación de los TRPs, es pobremente entendido comparado con los canales activados por voltaje.

1.6.2. Canales TRP en células cebadas

Las CCs humanas y de roedor, expresan varios canales TRP y, considerando que las CCs no solo se activan por Ag, sino también por varios estímulos físicos como el frotamiento, la presión, el frío y el calor, esos estímulos podrían ser mediados por los TRPs.

Se ha reportado que todos los miembros de la familia TRPV están expresados en las CCs, excepto el TRPV3 y el TRPV5 (Bíró et al., 1998; Solís-López et al., 2017; Stokes et al., 2004), y se ha propuesto que la función principal de esos canales en las CCs activadas a través del FcεRI, es la modulación de la entrada de Ca²⁺ (Freichel et al., 2012). En ese sentido, se ha encontrado la expresión del TRPV1 en diversos fenotipos de CCs (Bíró et al., 1998), aunque los mecanismos detallados de su activación y sus consecuencias en la secreción de mediadores se desconocen.

1.7 TRPV1

El TRPV1 es el más estudiado de los TRPs y fue el primer miembro de la subfamilia TRPV descubierto. Se trata de un receptor polimodal de calor, pH y algunos compuestos picantes que provocan sensación de dolor (Bevan, S., Quallo et al., 2014; Gouin et al., 2017), que al activarse, funciona como un canal catiónico no selectivo, que muestra igual permeabilidad para Na⁺, K⁺, cesio (Cs⁺), litio (Li⁺) y rubidio (Rb⁺). Sin embargo, la permeabilidad para cationes divalentes fisiológicamente relevantes es mayor que para el Na⁺, con una permeabilidad al Mg²⁺ menor en comparación al Ca²⁺. Por lo tanto, se considera altamente permeable al Ca²⁺, mostrando preferencia por el Na⁺ en ausencia de Ca²⁺ extracelular (Bevan, S., Quallo et al., 2014; Bouron et al., 2015; Caterina et al., 1997; Samways & Egan, 2011; Taberner et al., 2016).

Inicialmente, fue clonado como el receptor a capsaicina (el compuesto picante de los chiles), aunque puede ser activado por múltiples estímulos. Algunos de ellos

incluyen: el calor nocivo (>42 °C), protones, vanilotoxinas, mediadores lipídicos endógenos, pH (<6.5) y algunos químicos picantes e irritantes en los alimentos (Bevan, S., Quallo et al., 2014; Smith & Nilius, 2013). El TRPV1, también responde a estímulos físicos como voltajes altamente despolarizantes en ausencia de otro estímulo y a voltajes muy positivos no fisiológicos para la célula (Bevan, S., Quallo et al., 2014; Taberner et al., 2016). Además, el TRPV1 se ha considerado como un sensor de oxidantes, en el que la oxidación y S-nitrosilación de residuos conservados de cisteína en su extremo N- terminal podrían participar en su activación (Sakaguchi & Mori, 2020). El canal puede ser bloqueado farmacológicamente por la capsazepina (Vriens et al., 2009).

Estructuralmente, el TRPV1 y otros TRPs son homólogos a los canales de K^+ operados por voltaje. Por lo tanto, el TRPV1 se ensambla en un homotetrámero que forma un canal rectificador saliente. Exhibe una conductancia de 50-100 pS. La cinética del canal muestra que tiene múltiples estados abiertos y cerrados. La base estructural para el cambio en la selectividad iónica radica en la dilatación del poro. A la vez que, la capacidad de provocar la dilatación del poro parece depender del ligando o del modo de activación. Sin embargo, no se correlaciona con ninguna diferencia obvia en la amplitud o la velocidad de la respuesta (Bevan, S., Quallo et al., 2014; Kalia & Swartz, 2013; Smutzer & Devassy, 2016).

La regulación del TRPV1 es compleja. Las vías reguladoras endógenas, actúan mediante la activación de diferentes cascadas de señalización que promueven modificaciones post-traduccionales a través de mecanismos de fosforilación y desfosforilación dependientes de Ca^{2+} (Bonnington & McNaughton, 2003; Taberner et al., 2016). Por lo tanto, el TRPV1 contiene múltiples residuos y regiones clave en sus extremos citosólicos cuya fosforilación conducen a una mayor sensibilidad a estímulos químicos o térmicos, facilitando así su activación o fortaleciendo las corrientes evocadas por ese canal (figura 6). En ese sentido, la desfosforilación mediada por el influjo de Ca^{2+} parece participar en la desensibilización del TRPV1, lo que conduce a la inactivación del canal o a disminuir su afinidad por el agonista (Bevan, S., Quallo et al., 2014; Smutzer & Devassy, 2016).

El TRPV1, posee 6 repetidos de anquirina en su extremo N-terminal intracelular (figura 6), que unen a la CaM y al ATP para la modulación de la activación del canal, aunque, el extremo N-terminal tiene otros sitios de unión para CaM y ATP así como para otras cinasas como la PKA y la PI3K, de tal modo que contribuye de manera importante a la activación intracelular del canal (Bevan, S., Quallo et al., 2014; Xuming Zhang et al., 2005). El extremo C-terminal también interactúa con proteínas y ligandos, pues contiene dominios de unión para fosfoinosítidos, CaM, CaMKII y sitios consenso para la PKC (figura 6). El dominio TRP, está involucrado en la función de compuerta del canal y es un sitio de unión para el fosfatidil-inositol 4, 5 - bifosfato (PIP₂). También, es necesario para la activación alostérica del canal y podría regular la formación del tetrámero funcional del TRPV1. A su vez, el TRPV1 contiene otros sitios de unión para el PIP₂, el cual regula la sensibilidad del TRPV1 y su inserción en la membrana. Además, el extremo C-terminal contiene varias proteínas de interacción importantes para la fosforilación del TRPV1. Por ejemplo, la proteína AKAP79/150 actúa como una proteína de andamiaje que se une a la PKA, PKC y CaN, reclutando a esas enzimas cerca del canal (Bevan, S., Quallo et al., 2014; Nilius & Owsianik, 2011; Smutzer & Devassy, 2016).

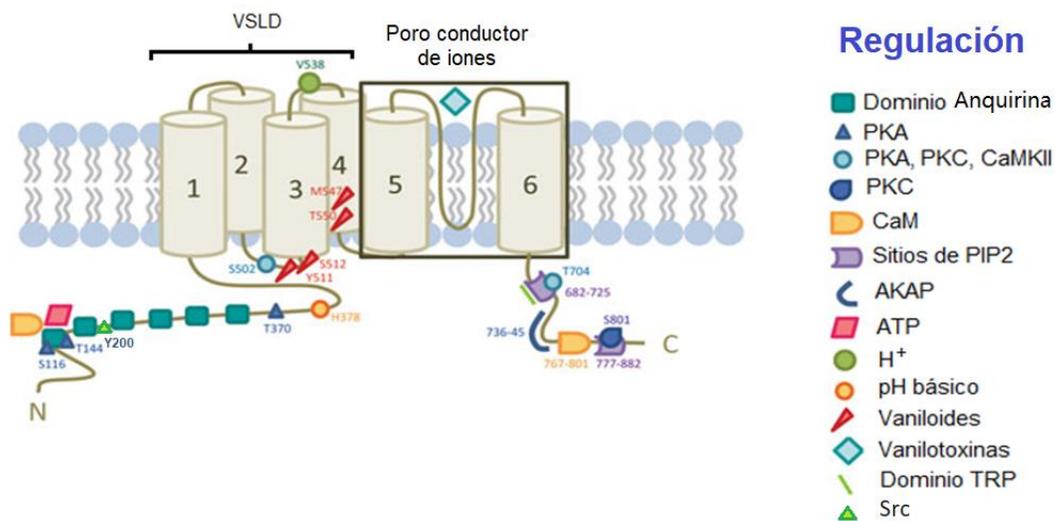


Figura 6. Aspectos estructurales y regulación del TRPV1. Cada subunidad del TRPV1 consiste en 6 segmentos transmembranales (ST). Los sitios de unión a ligando se localizan en el dominio similar al sensor de voltaje (VSLD, en los ST 1 - 4), en los ST 5 - 6, o en dominios intracelulares. El poro del canal, se encuentra entre el segmento 5 y 6. El extremo citosólico del segmento 6, forma una puerta inferior que se abre y se cierra para regular la entrada de cationes. Los extremos N y C-terminal citosólicos, están ocupados por varios dominios que regulan la función del canal y participan en el mecanismo de apertura. Modificada de: Bevan, S., Quallo, T., Andersson, D. A. and, Zygmunt, P. M., & Högestätt, E. D. (2014). Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels:

1.8 Medición de la movilización de calcio

El uso de diferentes técnicas experimentales nos ayuda a estudiar aspectos distintos de la señalización por Ca^{2+} , así como las propiedades eléctricas y la participación de canales iónicos permeables a ese ion. También, es posible determinar el origen del Ca^{2+} con la ayuda de herramientas farmacológicas. Lo anterior, nos permite relacionar esas mediciones con los cambios tanto fisiológicos como bioquímicos observados *in vitro* con un abordaje multidisciplinario.

Existen diversidad de técnicas para determinar los niveles en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sin embargo, en la figura 7 se comparan dos métodos capaces de medir la señal de Ca^{2+} . Por ejemplo, los métodos fluorométricos (figura 7a), permiten la determinación secuencial de los niveles de Ca^{2+} en millones de CCs estimuladas en un corto periodo de tiempo. En esa técnica, un fluorómetro mide la intensidad de fluorescencia de un reactivo fluorescente que se combina con el Ca^{2+} para leer los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la muestra (Kaposi et al., 2008), y el uso de herramientas farmacológicas permite determinar el origen del Ca^{2+} (SOCE o ROCE) y la participación de canales iónicos específicos en los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

En cambio, los métodos electrofisiológicos involucran la formación de un sello de alta resistencia entre una micropipeta (que contiene en su interior una solución electrolítica y un electrodo de registro conectado a un amplificador de la señal eléctrica), con la membrana de una célula única (en contacto con una solución extracelular o de baño). Ese sello, aísla eléctricamente el parche o “patch” de la membrana plasmática de tal modo que, todos los iones que fluyen a través del parche (de la membrana hacia la micropipeta), serán registrados por medio de diferentes configuraciones (Molleman, 2003). Por lo tanto, esa técnica mide las propiedades eléctricas de la membrana celular, la corriente eléctrica total que se genera del flujo iónico a través de la actividad simultánea de múltiples canales iónicos membranales mediante la configuración de célula completa por ejemplo y como puede apreciarse en la figura 7b o las propiedades eléctricas de un solo canal

a través de otra configuración (Conforti, 2012). Además, en los métodos electrofisiológicos es posible aislar la corriente de Ca^{2+} de las otras corriente iónicas y determinar el grado de participación de canales de membrana específicos en esa corriente, así como determinar el origen del calcio (SOCE o ROCE) con la ayuda de herramientas farmacológicas, el control del voltaje de la membrana y la modificación de la composición de las soluciones de registro.

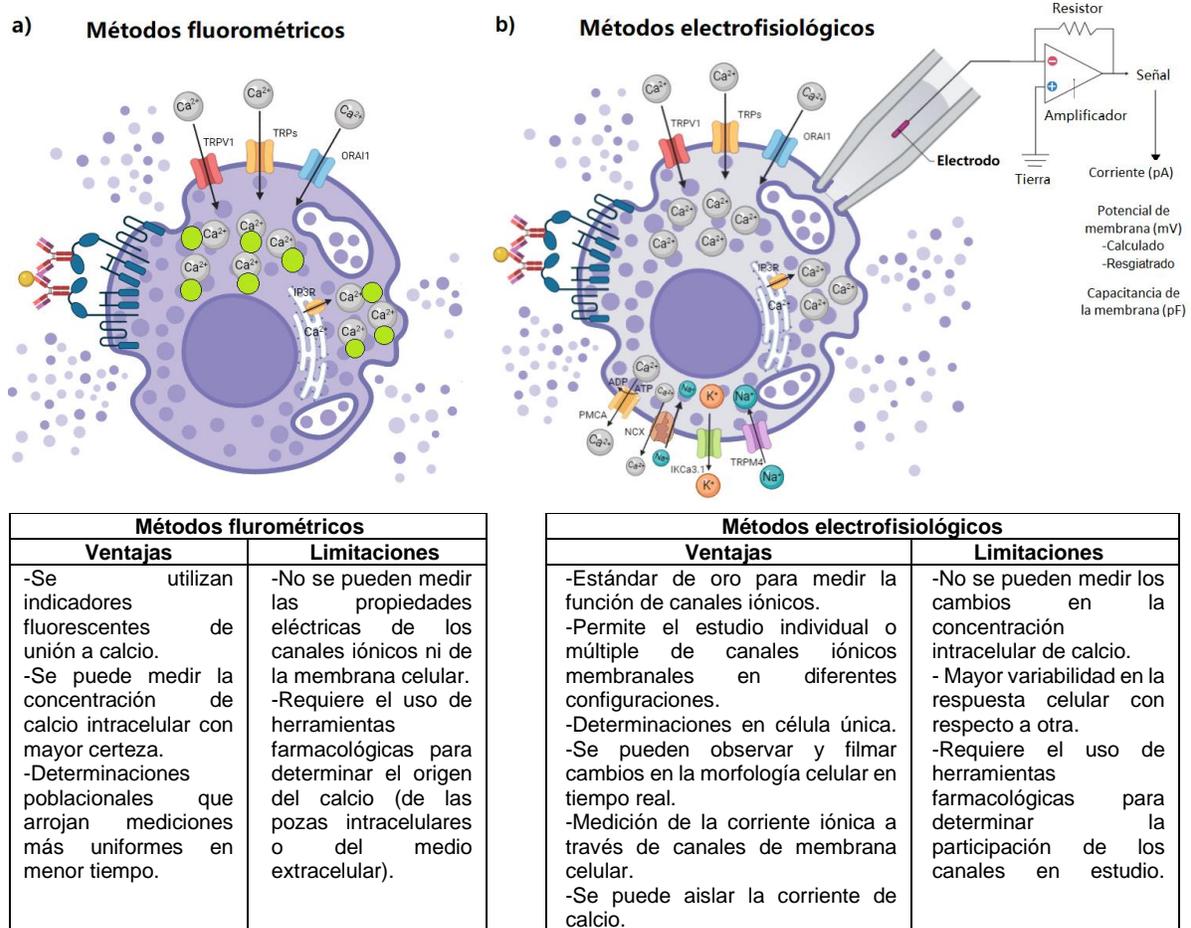


Figura 7. Comparación de dos técnicas de medición de calcio aplicadas a células cebadas.
a) Medición de la concentración de calcio intracelular a través de métodos fluorométricos y utilizando fluoróforos sensibles a la unión a calcio. El cuadro inferior muestra las ventajas y limitaciones de la técnica. **b)** Medición de la corriente de calcio a través de canales membranales permeables a ese ion con métodos electrofisiológicos. La figura muestra la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa. En esa configuración, el parche con la membrana se rompe, permitiendo el contacto eléctrico directo del electrodo (conectado al amplificador) en la micropipeta con el citosol, además de la diálisis del citosol y el reemplazo con la solución en la micropipeta (de composición similar al citosol). A su vez, un electrodo en la solución del baño es usado como tierra y ajusta el nivel cero. Por lo tanto, el electrodo del parche estará de un lado de la membrana y el electrodo de la tierra estará del otro, permitiendo el registro directo del potencial y la capacitancia de la membrana. Después, se fija el potencial de membrana a un valor cercano al potencial de membrana en reposo fisiológico y se registra la corriente. El cuadro inferior muestra las ventajas y limitaciones de la técnica. NCX: intercambiador sodio / calcio; PMCA: ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática.

TRPs, KCa3.1: canal de K⁺ de conductancia intermedia, TRPM4: canal receptor de potencial transitorio melastatina 4.

1.8.1 Registro electrofisiológico de células cebadas

La técnica de patch-clamp fue introducida en 1976 por Neher y Sakmann y ha permitido el registro de la actividad de canales iónicos de la mayoría de células. Ninguna otra herramienta provee actualmente una visión más precisa o detallada de la función y regulación de los canales de Ca²⁺ (Armstrong et al., 2010). Se trata de un método de electrofisiología capaz de medir el potencial de membrana y la corriente que pasa a través de los canales de membrana celular, ver figura 7b (C. L. Hill & Stephens, 2021).

Las CCs se han empezado a estudiar por métodos electrofisiológicos debido a los mecanismos involucrados en la exocitosis celular y porque el flujo de iones a través de los canales participa de manera crítica en la desgranulación (Barrie & Bvsc, 1996). Durante el reposo, se ha identificado una corriente de rectificación entrante de K⁺ y una corriente de rectificación saliente de Cl⁻. Los canales iónicos que subyacen a esas corrientes regulan el potencial de membrana (PM) de BMBCs (Kuno et al., 1995). Por otra parte, las conductancias que se pueden observar durante la estimulación con antígeno, secretagogos o ligandos de canales iónicos incluyen la de los canales permeables a Ca²⁺ (Ian Ashmole et al., 2012; Duffy et al., 2015; Hoth & Penner, 1992), canales catiónicos no selectivos como los TRPs (Fasolato et al., 1993), canales de K⁺ con rectificación saliente (Qian & McCloskey, 1993) y canales de Cl⁻ con rectificación saliente (Romanin et al., 1991).

1.9 Antecedentes

Debido a la importancia de la participación de los canales iónicos en el proceso de activación alérgica de las CCs, estudios recientes han investigado el papel de los canales TRP en ese tipo celular.

Estudios previos han reportado la expresión del canal TRPV1 en diferentes modelos de CCs (Freichel et al., 2012). El ARN mensajero transcrito por el gen *Trpv1*, se ha encontrado en células de leucemia basofílica de rata o RBL-2H3 (Stokes et al.,

2004), en la línea celular de leucemia humana HMC-1 (D. Zhang et al., 2012), en CCs de vejiga (Lazzeri et al., 2004) y piel humana (Ständer et al., 2004), y en CCs peritoneales de ratón (Solís-López et al., 2017).

La fosforilación y desfosforilación son dos de los principales mecanismos de regulación de la actividad de los TRPs (Yao et al., 2006), y como se mencionó anteriormente, el TRPV1 contiene muchos sitios de fosforilación para diferentes cinasas. Estudios previos han reportado que las cinasas de la familia Src juegan un papel importante en la regulación de las corrientes evocadas por el TRPV1 con capsaicina en neuronas del ganglio de la raíz dorsal obtenidas de la medula espinal de ratas Sprague-Dawley. En ese estudio, las corrientes evocadas por la capsaicina fueron bloqueadas completamente por un inhibidor de las cinasas de la familia Src (PP2), mientras que las corrientes mejoraron en presencia de un inhibidor de fosfatasa de tirosinas (ortovanadato de sodio) y, también en células embrionarias de riñón humano (HEK-293) co-transfectadas con plásmidos de ADNc que codifican para el TRPV1 y para la cinasa c-Src. (Jin et al., 2004). Otras investigaciones demostraron que la cinasa Src se une y fosforila al TRPV1 en el residuo Y200 (figura 6), en la línea celular HEK-293 transfectadas con el TRPV1 silvestre o el TRPV1 mutante en diferentes residuos y con la cinasa c-src, estimuladas a través del receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF), el TrkA (Xuming Zhang et al., 2005). Conjuntamente, otro estudio demostró la interacción y la participación directa de la cinasa Lyn en la regulación del canal TRPV4, un homólogo cercano del TRPV1 en células HEK-293 transfectadas con el canal y estimuladas con estrés hipotónico. Además, en ese estudio la sobre expresión de Lyn aumentó la fosforilación del TRPV4 en tirosinas tanto en condiciones control y aún más, en presencia del estrés hipotónico, mientras que la transfección con la mutación dominante negativa de la cinasa Lyn suprimió esa fosforilación más no la eliminó por completo sugiriendo que Lyn es la principal cinasa involucrada (Xu et al., 2003).

Por lo anterior, se investigó si la cinasa Lyn participa en el mecanismo de apertura del canal TRPV1 en BMMCs activadas a través del FcεRI.

2. Planteamiento del problema

Como puede apreciarse, es poco lo que se sabe del grado de participación de los canales TRP en la desgranulación anafiláctica y se desconoce el mecanismo de su apertura en CCs.

En ese sentido, los roles fisiológicos del canal TRPV1 están bien caracterizados en el sistema nervioso como sensor polimodal y por su papel en la electrogénesis. Sin embargo, poco es lo que se sabe del grado de participación y el mecanismo de apertura de ese canal en la desgranulación anafiláctica de CCs en respuesta a la activación del receptor FcεRI.

3. Hipótesis

- 1) La activación del receptor FcεRI conducirá a la apertura del canal TRPV1 expresado en BMMCs de ratón con la participación de la cinasa Lyn.
- 2) El canal TRPV1 contribuirá a la entrada de calcio extracelular necesaria para la desgranulación anafiláctica.

4. Objetivo general

Caracterizar el papel del canal TRPV1 en respuesta a la activación del receptor FcεRI en BMMCs de ratón, analizando la participación de la cinasa Lyn en el mecanismo de apertura.

5. Objetivos particulares

Utilizando BMMCs:

1. Evaluar la apertura del canal TRPV1 en respuesta a la activación del receptor FcεRI y su participación en el influjo de calcio mediante electrofisiología.
2. Analizar la participación del canal TRPV1 en la desgranulación anafiláctica resultado de la activación del receptor FcεRI.
3. Determinar si la cinasa Lyn participa en el mecanismo de apertura del TRPV1 en respuesta a la activación del receptor FcεRI.

6. Materiales y Métodos

6.1 Generación, cultivo y sensibilización de BMMCs

6.1.1. Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6J (stock no. 000664, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) y Lyn^{-/-} (C57BL/6J The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) de 25-35 g, de sexo indistinto, alimentados con dieta comercial estándar y agua *ad libitum* (Gomez et al., 2005). Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, a una temperatura de 23 ± 2 °C y con humedad relativa controlada. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Protocolo # 383-07) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav).

6.1.2 Cultivo para BMMCs

Se extrajo la médula ósea del fémur de los ratones (Meurer et al., 2016) y se cultivó en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, 100 UI / mL de penicilina, 100 µg / mL de estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA), HEPES 20 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 6.5 mM y albúmina sérica bovina (BSA) al 0.05 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Adicionalmente, se agregó IL-3 hasta una concentración final de 10 ng / mL (PreproTech, Rocky Hill, NJ, USA) para inducir la diferenciación de los precursores a MMCs.

El medio de cultivo se recambió cada 5 - 7 días, colectando las células no adherentes y re-suspendiéndolas en medio de cultivo fresco a una concentración final de 1×10^6 células/ mL. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora Binder a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después de 5 - 6 semanas de cultivo, 97 – 99 % de las células fueron positivas a la tinción del FcεRI medida mediante un ensayo de citometría de flujo estándar.

6.1.3 Sensibilización de BMBCs

De manera rutinaria se sensibilizaron las BMBCs con 100 ng / mL de IgE monoclonal anti-dinitrofenil (clona SPE-7 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 18 - 24 h previas a cada experimento y se mantuvieron a 37 °C.

6.2 Reactivos

IgE monoclonal de ratón anti-dinitrofenil; Dinitrofenil acoplado a albúmina en suero humano (DNP-HSA); capsaicina (agonista selectivo del TRPV1); AMG 9810 y capsazepina (antagonistas del TRPV1); dimetil sulfóxido (DMSO), p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (P-NAG); tetrasodio del ácido egtazico (EGTA); HEPES; HCl; KOH; NaATP (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

6.3 Electrofisiología

Las corrientes membranales se registraron con la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa en fijación de voltaje, pues representa el estándar de oro para medir la función de canales iónicos (Molnar & Hickman, 2007). Se distribuyeron $1 - 1.5 \times 10^6$ BMBCs / mL en una caja de 48 pozos (generalmente 1 mL / pozo). Se re-suspendió el sobrenadante de las células sensibilizadas y se transfirieron 45×10^3 células en 30 μL de medio de cultivo a un portaobjetos electrocargado (starfrost adhesive slides, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) previamente cortado a una medida de 8 mm x 8 mm, lavado y esterilizado. Se dejaron adherir las células por 30 - 40 minutos a 37 °C. El portaobjetos con las células adheridas se trasladó a la cámara de registro donde fue perfundida continuamente (1 - 2 mL / min) con una solución extracelular Ringer estándar modificada con la siguiente composición (en mM): NaCl (140), KCl (2.8), MgCl₂ (2), HEPES (10), glucosa (5.6), CaCl₂ (2), pH = 7.2 - 7.3 (ajustado con HCl o KOH), osmolaridad = 290 ± 10 mOSm. Las células fueron estimuladas mediante perfusión continua en la solución extracelular con DNP-HSA (a la concentración de máxima desgranulación) durante 3 minutos y después tratadas con DNP-HSA + capsazepina por 3 minutos o pre-tratadas con capsazepina.

Se observaron las células con un microscopio Nikon Eclipse FN-S2N (Nikon, Tokio), acoplado a una cámara infrarroja de contraste de interferencia, con un objetivo de inmersión 40X. Visualmente se seleccionaron células adheridas al portaobjetos, aisladas, con dimensiones similares y sin desgranular.

Las pipetas se elaboraron con capilares de borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA) con una resistencia de 7 - 10 M Ω cuando se llenaron con una solución intracelular estándar con la siguiente composición (en mM): metanosulfonato de cesio (140), NaCl (10), MgCl₂ (1), NaATP (0.5), EGTA (1), HEPES (10), CaCl₂ (0.1), pH = 7.2 - 7.3 (ajustado con HCl o KOH), osmolaridad = 290 \pm 10 mOSm. En este estudio, dializamos a las células con EGTA (1 mM) y Ca²⁺ (0.1 mM) lo que evita la contaminación de la señal registrada, promueve a que la principal fuente de Ca²⁺ observada en la corriente provenga de la solución extracelular con Ca²⁺ (2 mM) y permite amortiguar las fluctuaciones y grandes incrementos en la [Ca²⁺]_i durante el registro (Berridge, 1995; Bödding & Penner, 1999; Hoth & Penner, 1992).

Se realizó el registro empleando un amplificador Axoclamp 1D (Axon Instruments, Union City, CA), a temperatura ambiente 21 - 23°C (fuera del rango de activación del TRPV1). Las señales fueron filtradas a 5 KHz, digitalizadas a 10 KHz con la Digidata 1332A (Axon Instruments, Union City, CA). Los datos se almacenaron con el programa informático pCLAMP v8.3 (Molecular Devices).

Se identificaron las propiedades pasivas de las BMMCs al inicio de cada experimento mediante el reconocimiento del PM y la capacitancia de la membrana celular (C_m). Manteniendo una fuga menor de 20 pA, se administraron pulsos de voltaje despolarizantes de 200 ms de duración, desde - 60 a + 60 mV con incrementos de 10 mV al inicio de cada condición, desde un potencial fijo de -20 mV (Talavera & Nilius, 2016). Se obtuvieron las curvas de voltaje corriente (V-I) y la densidad de la corriente. Este último, al ser un parámetro rutinariamente usado para caracterizar las corrientes iónicas (I) individuales a través de la membrana, generalmente asume que la magnitud de la I aumenta de manera proporcional al área de la membrana celular debido a un mayor número de canales expresados en

un área mayor. Además, frecuentemente se utiliza para normalizar la *I* (Kula et al., 2020).

6.4 Determinación de β -hexosaminidasa

Se midió la desgranulación de las CCs mediante la liberación de β -hexosaminidasa en los supernadantes celulares (Scott et al., 2001). Se sensibilizaron 7×10^6 de BMBCs, se centrifugaron a 500 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min y se re-suspendieron en buffer Tyrodes-BSA a 37° C. Grupos independientes de células, fueron pre-tratados con vehículo (DMSO al 0.001%), AMG-9810 a diferentes concentraciones (1, 10, 100, 1000 nM), capsazepina a diferentes concentraciones (1, 10, 100, 1000 nM) o con capsaicina (10 y 50 μ M) por 15 min, y se estimularon con diferentes concentraciones de antígeno (0, 1, 3, 9, 27, 81 ng / mL) por 1 hora a 37° C. Después, las células se colocaron en hielo por 2 minutos y se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y el pellet celular se lisó con 1 mL de tritón X-100 al 0.5%. Se transfirieron 60 μ L del sobrenadante, a una placa de 96 pozos con 40 μ L de P-NAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se incubó la placa a 37 °C por 1 hora. Se añadió a cada pozo 120 μ L de buffer carbonato/bicarbonato para detener la reacción y se observó un cambio en la coloración. Se cuantificó la liberación de β -hexosaminidasa en un lector de microplacas a 405 nm. La desgranulación neta se expresa como el porcentaje del total de β -hexosaminidasa liberada al medio después de la estimulación menos la liberada antes de la estimulación.

6.5 PCR genómico para genotipificación

Los ratones Lyn $-/-$ eran originalmente de un fondo genético 129SvImJ. Esos ratones, fueron cruzados al menos cinco veces con los de tipo silvestre (WT) C57BL/6J (ambos de Jackson Laboratories Bar Harbor, ME, USA) para obtener los ratones deficientes en Lyn con un fondo genético C57BL/6J (Jiménez-Andrade et al., 2013). El genotipo de cada ratón se analizó por PCR a partir de ADN genómico utilizando los siguientes cebadores: para Lyn secuencia sentido 5' CATAGCCTGAGTTAGTTCCTAGC 3', anti-sentido 5' TCACATATGAACATGTGTGTAC 3', se obtuvo un producto amplificado de 320 pb.

Para la neomicina secuencia sentido 5´ CTTGGGTGGAGAGGCTATTC 3´, anti-sentido 5´ AGGTGAGATGACAGGAGATC 3´ se obtuvo un producto amplificado de 280 pb. Se incluyó un marcador de ADN de 100 pb (Todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

En el momento del destete y en condiciones asépticas, se realizó la biopsia de los 2 cm terminales de la cola del ratón. Se procedió a la digestión del tejido y a la extracción del ADN. Se hizo una dilución 1:100 y se utilizaron 2 µL (5 - 50 ng / µL de ADN) para la PCR. Todas las muestras se cuantificaron y se midió la pureza del ADN con la relación A260 / 280 (1.8 – 2.0), A260 / 230 (2.0 ± 0.2) (Aguilera et al., 2015), en un equipo espectrofotómetro Nanodrop 2000 / 2000c y la lectura se realizó con ayuda del software Nanodrop 2000 / 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE, se tiñeron con bromuro de etidio y se analizaron en el transiluminador UVP EpiChem System con ayuda del software de análisis de imágenes Labworks 5.1.

6.6 Análisis estadístico

Todos los datos se representaron como media ± error estándar de la media (SEM) usando el software GraphPad Prism® versión 8 (Software GraphPad; La Jolla, CA, USA). Se realizó análisis de varianza ANOVA de una o dos vías, seguido de la prueba de Dunnet para comparar los grupos de tratamiento contra el control o de Tukey para comparar los grupos experimentales. Mientras que, para las relaciones V-I se realizó una regresión lineal y se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson.

7. Resultados

7.1. Las BMMCs tienen un potencial de membrana en reposo negativo

Debido a que las CCs se consideran células no excitables, se decidió comenzar con el análisis de las propiedades eléctricas pasivas de las BMMCs, tales como el potencial de membrana en el reposo (PMR) y la capacitancia de la membrana (C_m).

El PMR (medido en mV), es resultado de la separación de cargas a través de la membrana celular y está determinado por un balance en el flujo de corriente controlado por la conductancia de canales iónicos membranales (Kandel et al., 2014), es decir, depende de las concentraciones iónicas a cada lado de la membrana y de la permeabilidad de la membrana a cada ion.

La determinación del PMR en las BMMCs es importante ya que los cambios en el PM proveen la fuerza impulsora para la entrada de Ca^{2+} . Por lo anterior, se obtuvo el potencial de *unión-líquida*, que surge de la diferencia en la composición y el movimiento iónico en la interfaz entre dos soluciones salinas (la que se encuentra en la pipeta de registro que va a dializar el citosol, con la solución del baño extracelular), (Walz, 2007). Con ayuda del software clampex 11.1 molecular devices (patch-clamp measurements, whole cell, standard salt-solution electrode) se calculó un potencial de *unión-líquida* de - 22.2 mV para BMMCs (anexo 1). Ese parámetro, resultó similar al PMR registrado de alrededor de - 20 mV en BMMCs de ratones C57BL/6J crecidas en medio RPMI 1640 no estimuladas (figura 8), con la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa en fijación de corriente $I = 0$ (Leech & Holz 4th, 1994; Walz, 2007). Cabe destacar que en el estado basal, observamos en todas las células analizadas una combinación de corriente entrante y saliente (anexo 3b), que se relaciona con el valor de PMR obtenido. Lo anterior, indica que las CCs mantienen un PMR negativo que se relaciona con la corriente iónica en el estado basal y que durante la estimulación los potenciales de membrana más hiperpolarizados que ese valor en el reposo, van a favorecer la entrada de Ca^{2+} , mientras que los potenciales de membrana más despolarizados durante la estimulación la van a limitar.

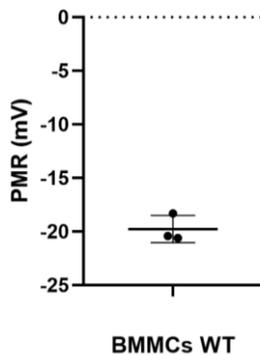


Figura 8. Potencial de membrana en reposo registrado en BMMCs WT de ratón. Registro electrofisiológico del potencial de membrana en reposo (PMR) de BMMCs WT (n=3), no estimuladas, en la configuración de célula completa en fijación de corriente, $I = 0$. La gráfica muestra la media \pm S.E.M. y los datos individuales.

7.2.El TRPV1 es funcional en las BMMCs, se abre en respuesta a la activación del FcεRI y es sensible a la inhibición por capsazepina

Para analizar si el canal TRPV1 es activado en las BMMCs estimuladas a través del receptor FcεRI, se utilizó la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa en fijación de voltaje. Una vez que se estandarizó la técnica (anexo 2), se realizó el registro electrofisiológico de BMMCs WT. Aplicando un protocolo de pulsos de voltaje despolarizantes de 200 ms de duración, desde -60 a +60 mV, con incrementos de 10 mV y un potencial fijo de -20 mV (anexo 3a), se obtuvo la curva V-I del registro basal (figura 9a, línea negra y anexo 4a) y la densidad de la corriente (figura 9b, línea negra).

Para estudiar la apertura de los canales iónicos en la membrana de las BMMCs en respuesta a la activación del FcεRI, de manera rutinaria se estimularon a las BMMCs con el antígeno DNP-HSA (10 ng/ mL) por 3 minutos, debido a que esa concentración induce una liberación importante de β-hexosaminidasa (anexo 5). La activación del receptor FcεRI provocó un aumento significativo de la corriente entrante registrada con respecto a la corriente basal (figura 9a y b, línea roja), con un potencial de reversión de alrededor de 0 mV (potencial de membrana en el que no hay flujo iónico neto) y que se continúa con una rectificación saliente de la corriente. Adicionalmente, fue posible observar a través del microscopio un movimiento vigoroso e inmediato de los gránulos citoplasmáticos, junto con un aumento temprano del tamaño celular, la salida de paquetes de heparán sulfato de la membrana, perdieron su forma esférica y disminuyeron su tamaño (anexo 4b,

consultar material suplementario). Esas observaciones se prolongaron hasta la caída de la corriente después de 9 minutos de estimulación (figura 9c, línea verde).

A su vez, se analizaron los cambios en la corriente inducida por la estimulación dependiente del FcεRI en células WT con respecto al tiempo (figura 9c). Se estimularon las BMMCs hasta 9 minutos y se registró la corriente a los 0 – 3 minutos de estimulación (figura 9c, línea roja), 4 – 6 minutos de estimulación (figura 9c, línea morada), 7 - 9 minutos de estimulación (figura 9c, línea verde) y se compararon con la corriente basal (figura 9c, línea negra). Las corrientes registradas durante 0 a 6 minutos de estimulación fueron significativamente mayores con respecto a la basal, mientras que la corriente obtenida durante los 7 – 9 minutos de estimulación no mostró diferencias comparado con el reposo. Lo anterior sugiere que la corriente activada por la estimulación del FcεRI, se mantiene hasta por 6 minutos y regresa a los valores basales alrededor de los 9 minutos en este protocolo. Cabe destacar que la corriente observada a los 4 – 6 minutos de estimulación fue significativamente mayor que la obtenida a los 0 – 3 minutos que, además, mostró una rectificación entrante de la corriente más pronunciada (figura 9c, línea morada), que no detectamos en los primeros 3 minutos de estimulación (figura 9a, b y c línea roja).

Posteriormente, se evaluó la participación del canal TRPV1 en la corriente registrada en las células activadas por el Ag utilizando al antagonista competitivo capsazepina, que inhibe la corriente evocada por la apertura de ese canal (Brito et al., 2014; Mamatova & Kang, 2013). Ese compuesto compite por el sitio de unión a capsaicina en el canal TRPV1 inhibiendo su apertura (Vriens et al., 2009).

El tratamiento con capsazepina (10 nM) por 3 minutos (figura 9a y b, línea azul), provocó la disminución en la corriente registrada durante la perfusión del DNP-HSA hasta niveles cercanos a la corriente basal. Al mismo tiempo, durante el registro se observó una disminución en el movimiento granular, las células que estaban desgranulando se estabilizaron (anexo 4d, consultar material suplementario), y soportaron mayores tiempos de registro. A su vez, el tratamiento con capsazepina por 3 minutos en células no estimuladas no produjo diferencias observables en las BMMCs (anexo 4c), ni en la corriente entrante posterior a la activación del FcεRI la

cual, mostró una disminución significativa de la corriente saliente a potenciales de membrana positivos (figura 9d, línea roja), con respecto a la corriente basal. En conjunto, estos datos sugieren que el canal TRPV1 en BMMCs es funcional y que la activación del FcεRI en CCs activa una corriente entrante que presenta una rectificación saliente (característica de corrientes evocadas por el TRPV1), que es sensible a la inhibición por capsazepina, implicando la participación del TRPV1 en la corriente registrada.

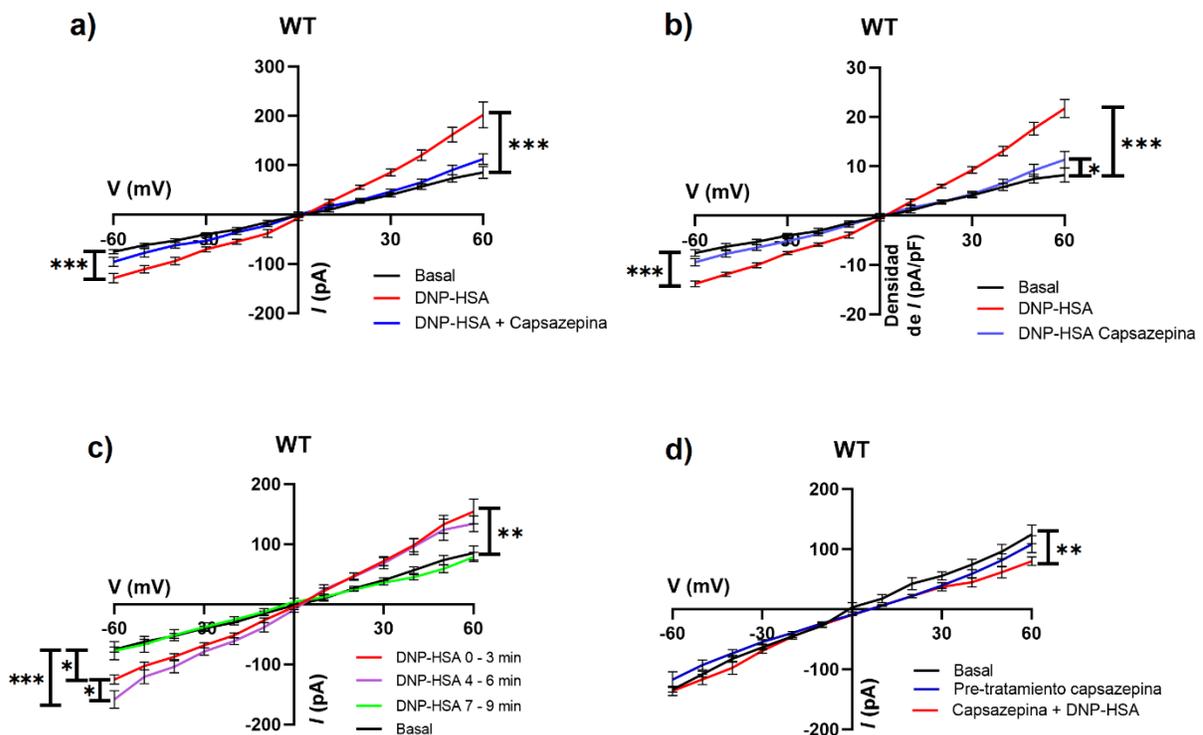


Figura 9. Registro electrofisiológico de la corriente activada a través del FcεRI en BMMCs WT de ratón y la participación del canal TRPV1. **a)** Relación V-I de la corriente obtenida del registro basal de células no estimuladas (en color negro, $r^2 = 0.9238$, $y = 1.345 \cdot X + 1.137$); durante la estimulación con DNP-HSA (10 ng/ mL) por 3 minutos (en color rojo, $r^2 = 0.9$, $y = 2.587 \cdot X + 7.779$); y al tratamiento con capsazepina (10 nM) por 3 minutos (en color azul, $r^2 = 0.9065$, $y = 1.686 \cdot X + 1.224$); $n = 5$. **b)** Densidad de corriente expresada en (pA / pF) de los datos mostrados en a. Los valores se obtuvieron al normalizar la corriente obtenida en cada voltaje a la capacitancia de la membrana de cada célula; $n = 5$. **c)** Relación V-I de la corriente obtenida durante la estimulación con DNP-HSA (10 ng/ mL) por 0 a 3 minutos (en color rojo, $r^2 = 0.7882$, $y = 2.34 \cdot X + 4.641$); por 4 a 6 minutos (en color morado, $r^2 = 0.8524$, $y = 2.473 \cdot X - 5.658$); por 7 a 9 minutos (en color verde, $r^2 = 0.8467$, $y = 1.254 \cdot X - 0.9704$); y del registro basal de células no estimuladas (en color negro, $r^2 = 0.9238$, $y = 1.345 \cdot X + 1.137$); $n = 3$. **d)** Relación V-I de la corriente obtenida del registro basal de células no estimuladas (en color negro, $r^2 = 0.9238$, $y = 1.345 \cdot X + 1.137$); durante el pre-tratamiento con capsazepina (10 nM) por 3 minutos (en color azul, $r^2 = 0.9041$, $y = 1.782 \cdot X - 18.8$); durante la estimulación con DNP-HSA (10 ng/ mL) por 3 minutos (en color rojo, $r^2 = 0.9675$, $y = 2.473 \cdot X - 5.658$); $n = 2$. Las gráficas muestran la media \pm S.E.M. (regresión lineal, ANOVA de dos vías, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, seguido de la prueba post-hoc de Tukey).

7.3.El TRPV1 participa en los cambios en el área de superficie celular que ocurren como resultado de la activación del FcεRI

La Cm es directamente proporcional al área de superficie celular y es, por tanto un indicador del tamaño de la célula. Dado que las membranas biológicas tienen una capacitancia constante por unidad de área, el registro de la Cm es un parámetro útil independiente de la geometría que se modifica cuando el área de superficie cambia. Debido a lo anterior, esa medida puede emplearse para monitorear procesos celulares, tales como la exocitosis (Fernandez et al., 1984; Joshi & Fernandez, 1988; Neher & Marty, 1982).

Dado que la fusión de gránulos secretores con la membrana celular ocasionada por la estimulación de las CCs conlleva un cambio en el área de la superficie de la membrana celular (Joshi & Fernandez, 1988), se midieron los cambios en la Cm en respuesta a la estimulación a través del FcεRI. Se estudiaron 58 BMMCs sin estimular provenientes de 7 cultivos diferentes, registrando un valor promedio de Cm de 9.6 pF (figura 10). Después, se estimuló a las células con DNP-HSA (10 ng / mL) por 3 minutos. Se registraron 15 células de 6 cultivos diferentes, las cuales presentaron un aumento significativo del 31.13 % en el registro de la Cm (valor promedio de 13.94 pF), en comparación con las células no estimuladas (figura 10).

Posteriormente, para investigar la participación del canal TRPV1 en relación a esos cambios en el área de superficie celular causada por el FcεRI, las células recibieron un tratamiento con capsazepina (10 nM) por 3 minutos después de la activación de ese receptor. Se examinaron 6 células de 3 cultivos distintos que presentaron una disminución del 21.6 % con respecto a la capacitancia de células estimuladas, arrojando un valor promedio de Cm de 10.93 pF (figura 10), el cual, no arrojó diferencias significativas con respecto a las células no estimuladas. En suma, estos datos sugieren que el evento de exocitosis masiva evocada por la activación del FcεRI provoca cambios en el área de superficie celular que, son revertidos por la inhibición del canal TRPV1, favoreciendo el estado inicial de la membrana plasmática.

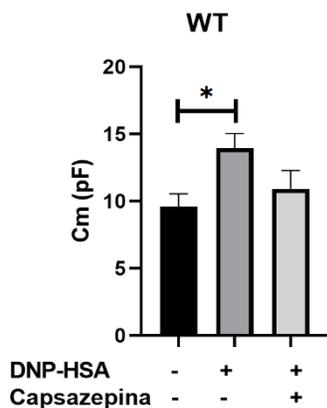


Figura 10. Participación del TRPV1 en los cambios en el área de superficie de la membrana de BMMCs WT de ratón en respuesta a la estimulación dependiente del FcεRI. Capacitancia de la membrana (Cm) de BMMCs sin estimular (n=7), estimuladas con DNP-HSA (10 ng / mL) por 3 minutos (n=6) y tratadas con el inhibidor TRPV1, capsazepina (10 nM) por 3 minutos; (n=3), en la configuración de célula completa en fijación de voltaje. La gráfica muestra la media ± S.E.M. (ANOVA de una vía, * p <0.05, seguido de la prueba post-hoc de Dunnett).

7.4. La apertura del canal TRPV1 inhibe la liberación de β-hexosaminidasa en BMMCs activadas a través del FcεRI

Teniendo en consideración los resultados obtenidos en los experimentos de electrofisiología descritos previamente, se prosiguió a explorar el papel del TRPV1 en la desgranulación de las BMMCs activadas a través del FcεRI. Debido a que las CCs pueden liberar hasta el 100 % de su contenido granular preformado y prealmacenado mediante la desgranulación anafiláctica en cuestión de minutos (Blank, 2011; A. M. Gilfillan & Beaven, 2011), se realizó la cuantificación de la liberación de β-hexosaminidasa en los supernadantes de BMMCs WT.

Primero, se decidió bloquear al canal y analizar la desgranulación inducida por el FcεRI. Se utilizaron dos antagonistas diferentes del TRPV1 (capsazepina y el AMG-9810) a diferentes concentraciones (1, 10, 100, 1000 nM) o vehículo en pre-tratamiento por 15 minutos. Después de dicho pre-tratamiento, las células se estimularon con DNP-HSA a concentraciones de (0, 1, 9, 27, 81 ng / mL) por 1 hora.

El pre-tratamiento de BMMCs WT con capsazepina no arrojó diferencias en la liberación de β-hexosaminidasa provocada por la activación del FcεRI a ninguna de las concentraciones utilizadas (figura 11a y b). Para analizar si algún efecto de la capsazepina sobre la desgranulación podía observarse en condiciones de estímulos de baja intensidad, las BMMCS se pre-trataron con las mismas concentraciones de capsazepina utilizadas previamente (1, 10, 100, 1000 nM) o con vehículo por 15 minutos y se disminuyó la concentración de DNP-HSA a (0.1 ng / mL), analizando

la secreción de β -hexosaminidasa una hora después. Aunque es necesario aumentar la muestra (número de cultivos utilizados), en esas condiciones, solamente se pudo observar una tendencia al aumento en la liberación de β -hexosaminidasa cuando las células se pre-incubaron con 10 nM de capsazepina (figura 11c).

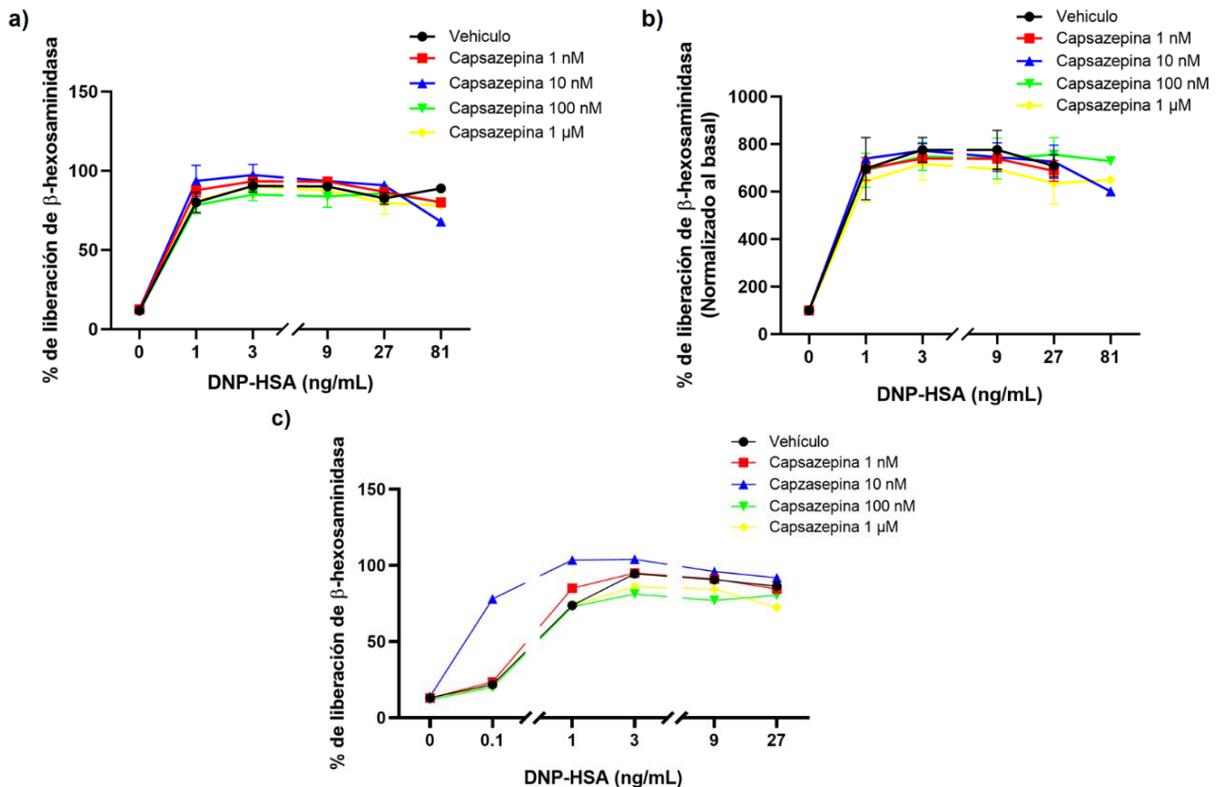


Figura 11. Curvas concentración respuesta de la inhibición del canal TRPV1 por capsazepina en BMMCs WT de ratón activadas a través del Fc ϵ RI. a) Ensayo de desgranulación de células WT (n=2), pre-tratadas por 15 minutos con el antagonista TRPV1, capsazepina (1, 10, 100, 1000 nM) o con vehículo DMSO al 0.001% y estimuladas con DNP-HSA (0, 1, 3, 9, 27 ng / mL) por 1 hora. **b)** Mismos datos mostrados en a), normalizados al basal. **c)** Ensayo de desgranulación utilizando BMMCs WT (n=1), pre- incubadas por 15 minutos con capsazepina (1, 10, 100, 1000 nM) o con el vehículo DMSO al 0.001%, y estimuladas con DNP-HSA a diferentes concentraciones (0, 0.1, 1, 3, 9, 27, 81 ng / mL) por 60 minutos. Las gráficas muestran la media \pm S.E.M. (ANOVA de dos vías en a y b, seguido de la prueba post-hoc de Tukey).

Con el fin de comprobar que el antagonismo del canal TRPV1 no modificaba la liberación de β -hexosaminidasa, también se usó el compuesto AMG-9810 (IC_{50} = 10^{-8}), que es un antagonista competitivo más potente que la capsazepina (IC_{50} = 10^{-7} – 10^{-6}) y que además, bloquea todos los mecanismos de apertura conocidos del TRPV1, incluyendo la activación por calor, protones y ligandos endógenos (Gavva et al., 2005; Vriens et al., 2009). Ambos compuestos bloquean el influjo de

Ca²⁺ a través del TRPV1 y han mostrado tener efectos en la producción de especies reactivas de oxígeno (Beider et al., 2020; M. H. Yang et al., 2019), sin embargo ese efecto no se evaluó en este trabajo.

El pre-tratamiento con AMG-9810 generó una tendencia al aumento en la liberación de β-hexosaminidasa provocada por la activación del FcεRI, que solo fue significativa a la concentración de 100 nM y a la concentración de 1 ng / mL de DNP-HSA (figura 12a y b).

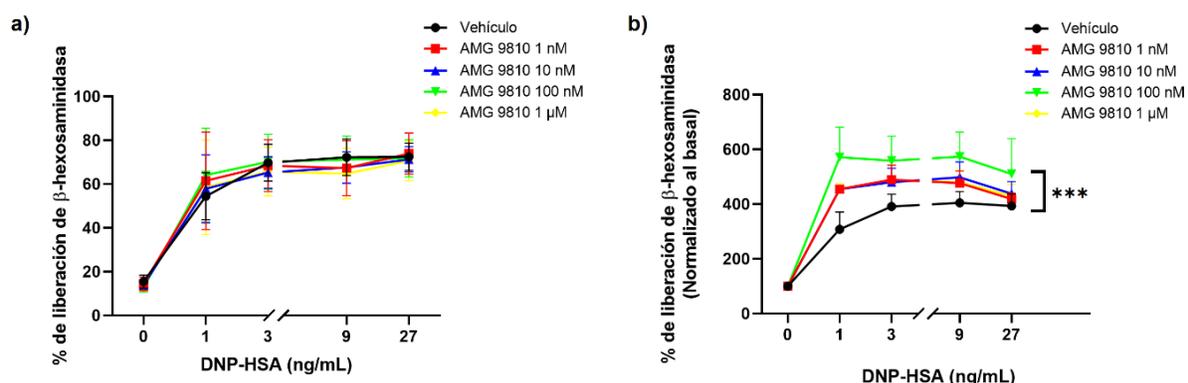


Figura 12. Curvas concentración respuesta de la inhibición del canal TRPV1 por AMG 9810 en BMMCs WT de ratón activadas a través del FcεRI. a) Ensayo de desgranulación de células WT (n=3), pre-tratadas por 15 minutos con el antagonista TRPV1, AMG 9810 (1, 10, 100, 1000 nM) o con vehículo DMSO al 0.001%, y estimuladas con DNP-HSA (0, 1, 3, 9, 27 ng/mL) por 1 hora. **b)** Mismos datos mostrados en a), normalizados al basal. Las gráficas muestran la media ± S.E.M. (ANOVA de dos vías, *** p <0.001, seguido de la prueba post-hoc de Tukey).

En vista de que el bloqueo farmacológico del TRPV1 provocó un aumento en la liberación de β-hexosaminidasa, se prosiguió a analizar el efecto de la apertura del TRPV1 sobre la desgranulación inducida por el FcεRI. Para ello, las células fueron pre-incubadas con el agonista exógeno del TRPV1, capsaicina (10 y 50 μM) porque ese compuesto activa solo al TRPV1 (Caterina et al., 1997), o con vehículo (anexo 6) por 15 minutos. Posteriormente, se estimularon con diferentes concentraciones de DNP-HSA (0, 1, 3, 9, 27 ng / mL) por 1 hora.

Los resultados obtenidos fueron distintos a los esperados en nuestra hipótesis, pues la apertura del TRPV1 provocó la disminución significativa en la liberación de β-hexosaminidasa (figura 13a y b). En conjunto, estos resultados apuntan a que, aunque el TRPV1 se abre en respuesta al FcεRI, el Ca²⁺ aportado por el canal no parece tener un papel relevante en la desgranulación anafiláctica de las CCs y que,

por el contrario, la apertura de ese canal está asociada con el control negativo de la señal que lleva a la desgranulación dependiente de complejos IgE/Ag.

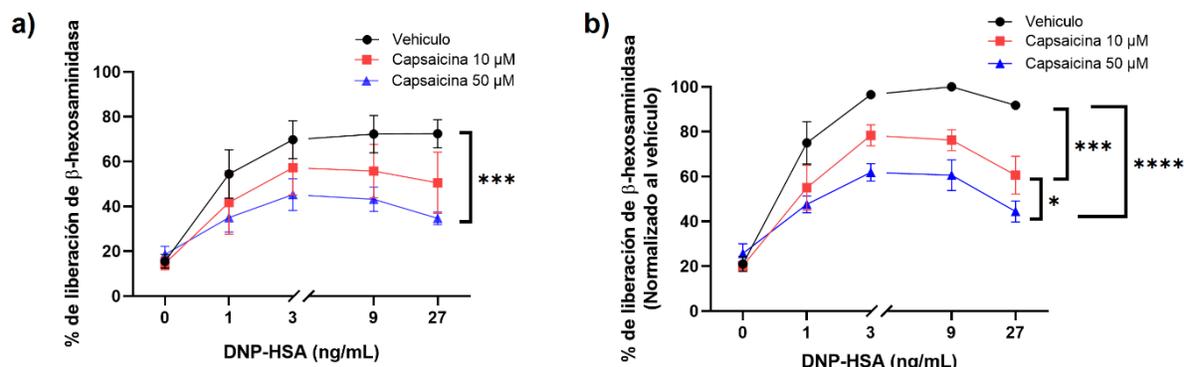


Figura 13. Curvas concentración respuesta de la apertura del canal TRPV1 en BMMCs WT de ratón activadas a través del FcεRI. a) Ensayo de desgranulación de células WT (n=3), pre-tratadas por 15 minutos con el agonista TRPV1, capsaicina (10 y 50 μM) o con vehículo DMSO al 0.001% y estimuladas con DNP-HSA (0, 1, 3, 9, 27 ng / mL) por 1 hora. b) Mismos datos mostrados en a), normalizados al vehículo. Las gráficas muestran la media ± S.E.M. (ANOVA de dos vías, *** p < 0.001, **** p < 0.0001, seguido de la prueba post-hoc de Tukey).

7.5. La cinasa Lyn no participa de manera importante en los cambios en el área de superficie celular que resultan de la activación del FcεRI y esos cambios son sensibles a la inhibición por capsazepina

Debido a que los resultados obtenidos en la figura 9a y b, indican que el canal TRPV1 se abre en respuesta a la activación del FcεRI en CCs, proseguimos a investigar la posible participación de la cinasa Lyn en la apertura del canal.

Primero, para evaluar si la ausencia de Lyn afectaría los cambios observados en la Cm de células WT, se analizó la Cm de BMMCs Lyn -/- por electrofisiología (figura 14), y se obtuvo un valor promedio basal de 8.58 pF en células no estimuladas. Después, se estimuló con DNP-HSA (10 ng / mL) por 3 minutos y se observó un incremento significativo del 35 % en la Cm, con un valor promedio de 13.19 pF (figura 14a). Este resultado indica que Lyn no participa de manera importante en la fusión de las membranas (gránulo - membrana plasmática), que se relaciona con la exocitosis.

Posteriormente, se administró el antagonista del TRPV1 capsazepina (10 nM) por 3 minutos, lo que indujo una reversión en el aumento de la Cm en 33.2 %, con un valor promedio de 8.36 pF (figura 14a).

Cuando esos cambios se compararon con los observados en células WT (figura 14b), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Por lo tanto, las BMMCs deficientes en Lyn exhibieron una respuesta parecida a la observada en las células WT como resultado de la activación del FcεRI y, aunque las BMMCs Lyn ^{-/-} mostraron una mayor inhibición en respuesta a la capsazepina, esta no fue estadísticamente significativa en relación a la observada en las WT (figura 14b). En conjunto, los resultados sugieren que esa cinasa no participa de manera importante en la desgranulación anafiláctica, ni en los cambios del área de superficie celular de CCs activadas a través del FcεRI y que, además, el antagonismo del canal TRPV1 después de la estimulación del FcεRI, revierte el aumento en la superficie celular.

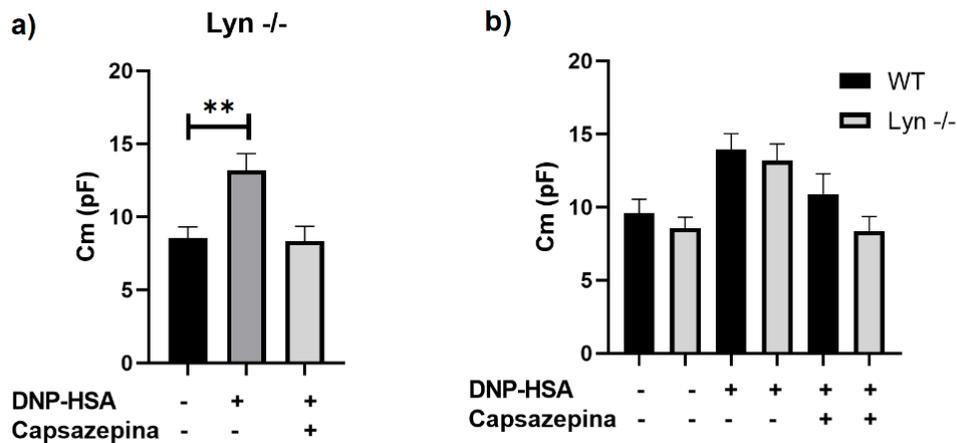


Figura 14. Registro electrofisiológico de los cambios en la capacitancia de la membrana de BMMCs de ratones Lyn ^{-/-} por la activación del FcεRI y el efecto de la inhibición del TRPV1. a) Capacitancia de la membrana (Cm) de BMMCs Lyn ^{-/-} (n=3), sin estimular; estimuladas con DNP-HSA (10 ng / mL) por 3 minutos; y tratadas con el inhibidor del TRPV1, capsazepina (10 nM) por 3 minutos. **b)** Comparación de los cambios en la capacitancia de la membrana de BMMCs Lyn ^{-/-} (n=3) con los observados en WT (n=7, 6 y 3), en respuesta a la estimulación dependiente del FcεRI y al antagonismo del TRPV1. Las gráficas muestran la media ± S.E.M. (ANOVA de una vía, ** p < 0.01, seguido de la prueba post-hoc de Dunnett en a y de Tukey en b).

7.6. La cinasa Lyn modula la movilización de calcio y la apertura del TRPV1 membranaral en BMMCs activadas por el FcεRI

Finalmente, para demostrar si la apertura del canal TRPV1 se ve afectada por la ausencia de Lyn, se repitieron los experimentos de electrofisiología realizados en el apartado 7.2 y mostrados en la figura 9a, b y c en BMMCs deficientes en esa cinasa. Se obtuvo la relación $V-I$ en el estado basal (figura 15a, línea negra) y la densidad de la corriente (figura 15b, línea negra). Después, se estimuló a las células con DNP-HSA (10 ng/ mL) por 3 minutos y se detectó una pequeña corriente entrante significativamente mayor a la basal en la relación $V-I$ (figura 15a, línea roja), que cuando se normalizaron los datos con respecto a la C_m (figura 15b, línea roja), no mostró diferencias significativas al compararla con los valores obtenidos en el reposo. Además, en el microscopio se observó un movimiento granular menor comparado con el mostrado por las células WT, así como cambios mínimos en el tamaño y forma de la membrana celular (anexo 7a, b y c, consultar material suplementario). Lo anterior, indica que la cinasa Lyn modula la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática en respuesta a la estimulación dependiente del FcεRI en CCs.

Al encontrar que la movilización de Ca^{2+} se encuentra modificada en ausencia de Lyn, comparamos la corriente basal de las células deficientes en Lyn con la de las células WT (figura 15c) y analizamos la corriente a diferentes tiempos de estimulación 0 – 3 minutos (figura 15d, línea roja), 4 – 6 minutos (figura 15d, línea morada), 7 – 9 minutos (figura 15d, línea verde). Los datos obtenidos mostraron que las BMMCs Lyn $-/-$ presentan una corriente basal significativamente menor que las células WT (figura 15c). Además, observamos que la ausencia de Lyn provoca un retraso en el aumento de la corriente entrante membranaral que aparece a partir de los 4 minutos de estimulación (figura 15d, línea morada) y que a diferencia de las células WT, se prolonga y no cae a los 9 minutos de estimulación (figura 15d, línea verde). Estos resultados apuntan a que la corriente total de Ca^{2+} está modificada por Lyn en CCs y que esa cinasa participa de manera importante en el inicio de la señalización por Ca^{2+} en respuesta al entrecruzamiento del FcεRI.

A continuación, se administró capsazepina (10 nM) por 3 minutos (figura 15a y b, línea azul) y esto no provocó cambios significativos en la corriente registrada con respecto al DNP-HSA, ni a la corriente basal. En suma, estos datos sugieren que la apertura del TRPV1 en BMMCs activadas a través del FcεRI ocurre por un mecanismo dependiente de la cinasa Lyn.

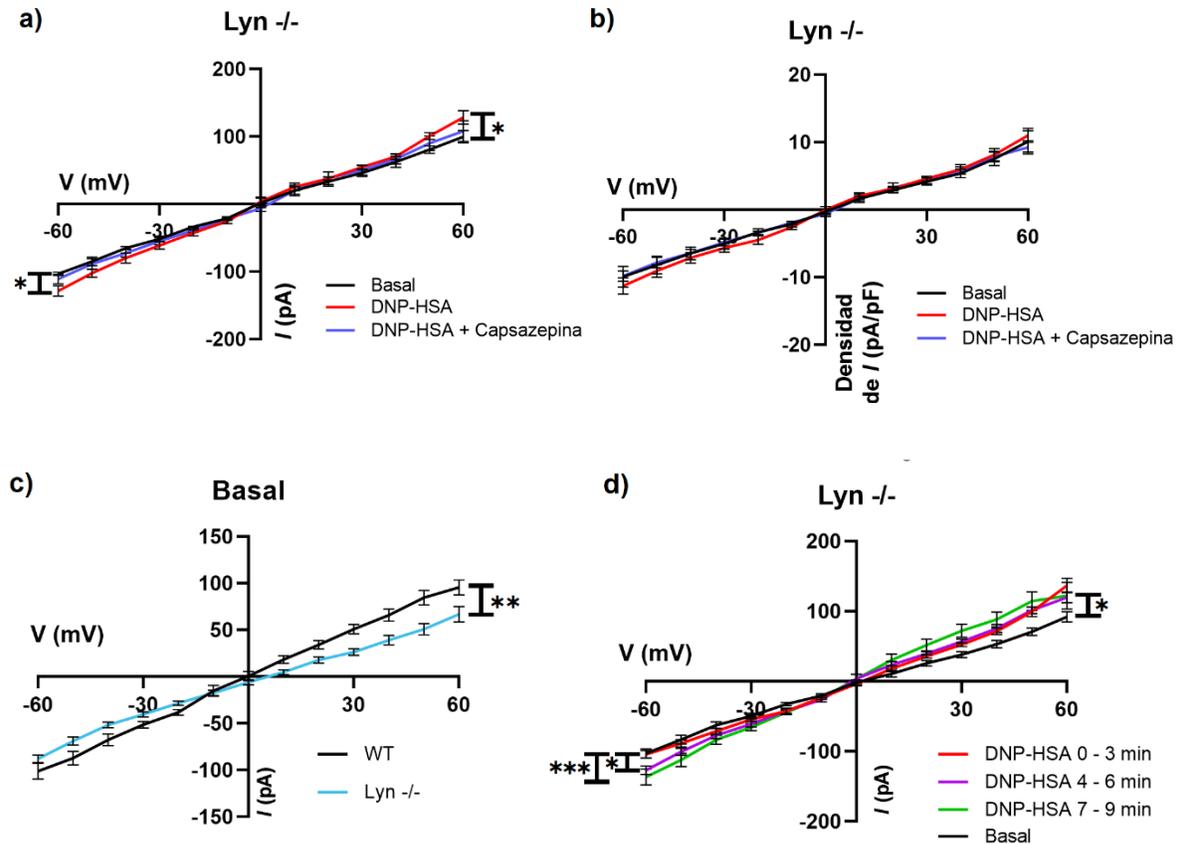


Figura 15. Registro electrofisiológico de la corriente activada por la estimulación dependiente del FcεRI en BMMCs de ratones *Lyn*^{-/-} y la participación del TRPV1. a) Relación V-I de la corriente registrada durante el registro basal de células no estimuladas (en color negro, $r^2 = 0.9609$, $y = 1.662 \cdot X - 1.120$); durante la estimulación con DNP-HSA (10 ng/ mL) por 3 minutos (en color rojo, $r^2 = 0.9637$, $y = 2.034 \cdot X - 1.523$); y al tratamiento con capsazepina (10 nM) por 3 minutos (en color azul, $r^2 = 0.9410$, $y = 1.798 \cdot X - 1.521$); (n=3). **b)** Densidad de corriente expresada en (pA / pF) de los datos mostrados en a). Los valores se obtuvieron al normalizar la corriente obtenida en cada voltaje a la capacitancia de la membrana de cada célula. **c)** Relación V-I comparando la corriente basal de BMMCs WT (en color negro, $r^2 = 0.9156$, $y = 1.687 \cdot X - 0.6258$) con la de BMMCs *Lyn*^{-/-} no estimuladas (en color azul, $r^2 = 0.8334$, $y = 1.212 \cdot X - 7.265$); (n=3). **d)** Relación V-I de la corriente obtenida durante la estimulación con DNP-HSA (10 ng/ mL) por 0 a 3 minutos (en color rojo, $r^2 = 0.9181$, $y = 1.889 \cdot X + 1.599$); por 4 a 6 minutos (en color morado, $r^2 = 0.9644$, $y = 2.015 \cdot X - 0.9917$); por 7 a 9 minutos (en color verde, $r^2 = 0.9299$, $y = 2.229 \cdot X + 1.623$); y del registro basal de células no estimuladas (en color negro, $r^2 = 0.9176$, $y = 1.543 \cdot X - 4.795$); (n=2). Las gráficas muestran la media \pm S.E.M. (regresión lineal, ANOVA de dos vías, * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$, seguido de la prueba post-hoc de Tukey).

8. Discusión

El estudio del papel de los canales iónicos en el proceso de desgranulación de las células cebadas estimuladas por el receptor FcεRI es un tema relevante para entender el fenómeno de secreción de mediadores inflamatorios que contribuyen a distintas respuestas fisiopatológicas y que dependen de ese tipo celular. En esta tesis demostramos que:

- 1) Las BMMCs de ratón presentan un potencial de membrana en reposo menos negativo en comparación con las células excitables.
- 2) El canal TRPV1 es funcional en BMMCs de ratón y el entrecruzamiento del FcεRI provoca la apertura del canal, participando así en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$.
- 3) Los cambios en el área de superficie celular coinciden con la apertura del TRPV1 inducida por la activación del FcεRI.
- 4) El TRPV1 regula negativamente la secreción de β-hexosaminidasa inducida por la activación del FcεRI.
- 5) La cinasa Lyn no participa de manera importante en los cambios en el área de superficie celular inducidos por la activación del FcεRI.
- 6) La apertura del TRPV1 membranar depende de la cinasa Lyn tras el entrecruzamiento del FcεRI.

8.1. Diferencias en el potencial de membrana en reposo entre las células cebadas y las células excitables

En todas las células y en particular en las excitables, existe una diferencia de potencial transmembrana relativamente constante llamada potencial de reposo. Esa diferencia de potencial se debe a la existencia de gradientes electroquímicos a ambos lados de la membrana y a las diferencias en la permeabilidad de la membrana celular a las distintas especies de iones. El PMR es mantenido gracias a la presencia de canales iónicos con permeabilidad selectiva en la membrana plasmática. El movimiento iónico a través de esos canales provoca diferencias de cargas electrostáticas a través de la membrana celular (Buño & Araque, 2006; Chrysafides et al., 2022).

Las células excitables, pueden transitar de un estado de reposo (sin estimular) a un estado excitado capaz de disparar potenciales de acción que permiten a las células comunicarse con otras a través de la liberación de neurotransmisores en el caso de las neuronas o la contracción muscular en el caso de la fibra muscular por ejemplo. Las propiedades pasivas determinan la velocidad y extensión espacial de la propagación de las respuestas activas, así como el curso temporal de las respuestas subumbrales (Buño & Araque, 2006; Chrysafides et al., 2022).

El PMR está definido por la diferencia en el potencial eléctrico a través de la membrana celular cuando la célula está en un estado no excitado, y se expresa por su valor intracelular con relación al espacio extracelular. Dada la distribución asimétrica de los iones a través de la membrana plasmática y a que existe una cantidad apreciable de proteínas cargadas negativamente en el citoplasma que no pueden atravesar la membrana celular, las células tienen un potencial intracelular negativo, cuyo valor radica típicamente entre -10 a -100 mV, por lo que la fuerza eléctrica tiende a permitir el influjo de iones cargados positivamente como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} hacia el interior de la célula y el eflujo de iones cargados negativamente como el Cl^- hacia el exterior de la célula. A su vez, la dirección del movimiento iónico está influenciada por las diferencias en la concentración de iones a cada lado de la membrana celular. La concentración intracelular de K^+ es mayor que en el exterior, por lo que las fuerzas de concentración dirigen el flujo del Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- hacia el interior y el del K^+ hacia el exterior de la célula. Además, el PM al cual las fuerzas eléctricas y de concentración están balanceadas para un ion dado se denomina potencial de equilibrio o potencial de Nerst para ese ion y el potencial de membrana al cual no hay flujo neto de corriente iónica se denomina potencial de reversión (Chrysafides et al., 2022; Ramahi & Ruff, 2014).

Dada la permeabilidad de la membrana plasmática de las células excitables al K^+ durante el reposo, el PMR se encuentra cercano pero no es exactamente igual al potencial de equilibrio del K^+ (de -90 mV). También, debido a que el Na^+ y otros iones escapan durante el reposo, el PM tiene un valor un poco menos negativo de alrededor de -70 mV en células excitables (Chrysafides et al., 2022). No obstante,

la mayoría de las células tienen un PM dinámico a pesar de no tener un fenotipo excitable, ya que, el PM está involucrado en una variedad de funciones biológicas esenciales y cambios sutiles en la expresión de canales iónicos le confiere al PM distintas propiedades (Kadir et al., 2018).

Hasta el momento, se han registrado diferentes PMR en distintos tipos de CCs. Por ejemplo, mediciones del PMR mediante la técnica de patch-clamp en CCs fueron descritas en 1986, utilizando un fenotipo de CTMCs, PMCs de rata (Lindau & Fernandez, 1986). En ese estudio no se reportó un PMR definido, dada la inestabilidad del PMR (Friis et al., 1997; Lindau & Fernandez, 1986). De manera similar, CCs derivadas de sangre periférica humana (HPBDMC), demostraron tener un PMR de alrededor de 0 mV (Duffy et al., 2001). Estudios en la línea celular RBL-2H3, que es un modelo de CCs inmortalizadas que representa un fenotipo mucosal (Jiménez et al., 2021), el PMR reportado fue de -90 a -70 mV (Kanner & Metzger, 1983). Las diferencias en el PMR que presentan distintos tipos de CCs podría deberse a una expresión diferencial de canales iónicos que subyace a cada fenotipo de CCs, debido a que se sabe que las condiciones de purificación y cultivo alteran la expresión de proteínas en ese tipo celular. Dada la heterogeneidad de CCs en los diferentes tejidos, el microambiente podría ser el responsable de regular la diversidad en los perfiles de expresión tanto de los receptores de membrana que determinan a qué tipo de cambios ambientales las CCs deben responder, como de los mediadores que liberan, los cuales, establecen como deben de responder las CCs ante esos cambios (Tanaka, 2020).

En este trabajo, nosotros encontramos que las BMMCs de ratón presentan un PMR negativo de alrededor de -20 mV y que ese valor coincide con la corriente iónica registrada durante el reposo. Ese valor difiere y es menos negativo que el PMR alcanzado por las células RBL-2H3, el cual, se debe principalmente a que en el reposo esas células presentan una corriente rectificadora entrante de K^+ que además, establece un PM cercano al potencial de reversión de los canales de K^+ (Lindau & Fernandez, 1986; Wischmeyer et al., 1995), mientras que, las PMCs y las HPBDMC son eléctricamente silentes al reposo (no muestran una conductancia

significativa) o expresan una conductancia rectificadora saliente de Cl^- (Friis et al., 1997; P. B. Hill et al., 1996; Lindau & Fernandez, 1986).

Investigaciones previas han descrito un perfil electrofisiológico heterogéneo en BMMCs durante el reposo, lo cual podría explicar el que no se haya reportado un PMR definido en ese fenotipo celular (Kuno et al., 1995). No obstante, todas las células analizadas en este estudio exhibieron una combinación tanto de la corriente rectificadora entrante como de la corriente rectificadora saliente al mismo tiempo en el estado basal (anexo 3b), lo que sugiere que el PMR de las BMMCs utilizadas en este trabajo está regulado tanto por la conductancia de los canales dependientes de K^+ como por la conductancia de los canales dependientes de Cl^- y, que ambas conductancias contribuyen al PM menos negativo que el reportado en las células excitables y las células RBL-2H3 (Hill et al., 1996).

8.2. Características de la corriente de calcio a través de canales iónicos membranales en las células cebadas

El entrecruzamiento del receptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ induce en CCs una mayor permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} a través de SOCs y ROCs (Kanner & Metzger, 1984). Investigaciones previas han descrito mediante mediciones electrofisiológicas dos componentes en la corriente entrante de Ca^{2+} membranal que ocurren de manera paralela en CCs. Uno de ellos es de aparición rápida y transitoria, de menor amplitud, no se activa por Ca^{2+} o IP_3 , se reduce por altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular y ocurre a través de canales ROCs no selectivos de ~ 50 pS (Fasolato et al., 1993). El otro componente es de aparición más lenta y se mantiene por mayor tiempo. Ocurre en respuesta al vaciamiento de las pozas intracelulares de Ca^{2+} (inducido por IP_3 o por el exceso del quelante de Ca^{2+} EGTA), a través de canales SOCs altamente selectivos al Ca^{2+} , no activados por voltaje, que presentan una característica rectificación entrante de la corriente (Hoth & Penner, 1992).

Nuestros resultados muestran que la activación del $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ provoca una corriente entrante seguida por una corriente saliente a potenciales de membrana positivos. Además, esa corriente bifásica se mantiene hasta por 6 minutos de estimulación

para regresar a los valores basales después de 9 minutos. De manera conjunta, nuestros hallazgos indican que la corriente entrante inducida por el entrecruzamiento del FcεRI registrada durante los primeros 3 minutos de estimulación comparte las características descritas en el componente ROCE de la corriente de Ca²⁺ (Fasolato et al., 1993), mientras que la iniciada a partir de los 4 a 6 minutos de estimulación parece corresponder al componente SOCE de la corriente de Ca²⁺ (Hoth & Penner, 1992).

Por otro lado, el registro electrofisiológico de corrientes inducidas por la capsaicina (el agonista TRPV1), muestra una corriente entrante pequeña, seguida de una característica rectificación saliente de la corriente a potenciales de membrana positivos reportada previamente en células HEK-293 transfectadas con plásmidos de ADNc codificante para el TRPV1 (Caterina et al., 1997), y en células T CD4⁺ que expresan constitutivamente al canal (Bertin et al., 2014). Así pues, la presente tesis es el primer trabajo en describir que la corriente inducida por la activación FcεRI comparte las características de la corriente evocada por agonistas del TRPV1, aunque nuestros registros también pueden estar mostrando la actividad de otros canales de Ca²⁺ como los SOCs, los ROCs o los canales de Ca²⁺ tipo L (Suzuki et al., 2010).

Estudios realizados en varias líneas de CCs, incluyendo BMMCs, reportaron que el uso agonistas específicos del TRPV1 inducen un aumento en la [Ca²⁺]_i y, que es inhibido por el antagonista capsazepina (Bíró et al., 1998). Sin embargo, en este trabajo demostramos por primera vez con técnicas electrofisiológicas que, la activación del receptor FcεRI en BMMCs provoca la apertura del canal TRPV1 expresado en la membrana de esas células. Asimismo, comprobamos que el bloqueo farmacológico del canal provoca una inhibición importante de la corriente inducida por la activación del FcεRI, lo que indica que el TRPV1 participa en la movilización de Ca²⁺ en ese tipo celular, aunque se desconoce si el mecanismo implicado en la entrada de Ca²⁺ es SOCE, ROCE o ambos.

8.3. La estimulación de células cebadas provoca cambios en el área de superficie celular

Durante la desgranulación anafiláctica, la membrana de los gránulos secretores se incorpora transitoriamente a la membrana celular y se recupera una vez que se expulsó el contenido vesicular al espacio extracelular (Thilo, 1985). Los eventos de fusión entonces, resultan en un incremento transitorio del área de superficie celular, que puede ser medido eléctricamente como un aumento en la C_m (Cabeza et al., 2013; Gillespie & Denton, 1979; Jaffe et al., 1978; Joshi & Fernandez, 1988; Neher & Marty, 1982).

Mediciones para monitorear los cambios en la C_m de CCs, debido a la fusión masiva de las membranas de los gránulos secretores con la membrana plasmática se han llevado a cabo usando la técnica de patch-clamp (Fernandez et al., 1984; Hamill et al., 1981; Neher & Marty, 1982).

Investigaciones previas, reportaron un valor de C_m de entre 5 - 11 pF en células PMCs no estimuladas (Almers & Neher, 1987; Fernandez et al., 1984; Joshi & Fernandez, 1988; Lindau & Neher, 1988). Ese valor aumentó de manera abrupta en un lapso de 79 ± 22 segundos cuando activaron a las PMCs a través de receptores acoplados a proteínas G (como el MRGPRX2) y alcanzó un nuevo estado estable en 3 – 5 minutos tras el inicio de la desgranulación (Fernandez et al., 1987). En esos trabajos, la fusión de gránulos produjo aumentos en la C_m de 10 - 20 pF después de la desgranulación en ese tipo celular (Fernandez et al., 1984; Joshi & Fernandez, 1988; Neher & Marty, 1982). Nuestros hallazgos coinciden con los valores iniciales y de estimulación reportados en CCs peritoneales. Sin embargo, es la primera vez que se reportan los cambios electrofisiológicos en el área de superficie celular de BMBCs en respuesta a la activación del $Fc\epsilon RI$, la cual, aumentó su valor en un 31.13%, ya que los trabajos que existen utilizan otros fenotipos de CCs y estimulan al receptor MRGPRX2.

Se ha descrito previamente que los cambios en la C_m de las CCs están fuertemente influenciados por los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$; que, independientemente de donde

provenga (pozas intracelulares o canales membranales), provoca aumentos en la conductancia, probablemente debidos a la apertura de canales iónicos en la membrana celular (Kanno et al., 1973).

Nuestros datos demuestran que el bloqueo farmacológico del canal TRPV1 inhibe el aumento en la Cm ocasionado por la activación del receptor FcεRI, demostrando que existe una relación entre el Ca²⁺ que entra a través de ese canal con los cambios más importantes en el área de superficie celular. Este es el primer trabajo en analizar la participación del TRPV1 en los cambios del área de superficie celular en respuesta a la activación del FcεRI en BMMCs.

Además, en este trabajo proponemos que el TRPV1 participa en la aparente salida del contenido granular que se observa al microscopio acoplado a la cámara infrarroja de contraste de interferencia en el registro electrofisiológico (ver material complementario) y en los cambios del área de superficie celular de manera diferencial, ya que el bloqueo farmacológico del canal después de su activación podría revertir los cambios en Cm inducidos por el FcεRI al promover la recuperación temprana de la membrana de los gránulos secretores, sin inhibir necesariamente el proceso de desgranulación en sí mismo como se observa en la figura 10 y 11 respectivamente.

En ese sentido, los cambios observados en la capacitancia se han asociado no solo con la exostosis de grandes gránulos, sino también con la exocitosis constitutiva y con la recuperación temprana de pequeñas vesículas posterior a la exocitosis en CCs (Almers & Neher, 1987). También, se han descrito eventos de endocitosis de grandes porciones de membrana, formados por la fusión acumulativa de los gránulos con la membrana (Cabeza et al., 2013). Lo que indica que la exocitosis en las CCs viene acompañada de distintas formas de endocitosis compensadora que, permite mantener el área de la superficie celular constante, mantener la morfología celular normal, impedir que la superficie membranal crezca indefinidamente y prevenir el agotamiento completo de las vesículas secretoras, como se aprecia en la figura 16a y b (Thilo, 1985; Xue & Mei, 2011).

Los eventos de endocitosis se miden electrofisiológicamente por la disminución en la Cm. No obstante, ese evento no ha sido observado con claridad en la configuración de patch-clamp que utilizamos en este trabajo (Cabeza et al., 2013). Además, oscilaciones transitorias en los valores de la Cm coincidieron con otras formas de endocitosis acoplada a exocitosis, como la exocitosis de besa y corre y la cavicaptura que fueron reportados en CCs utilizando una configuración de patch-clamp más sensible para observar esos cambios en la membrana, ver figura 16c (Cabeza et al., 2013).

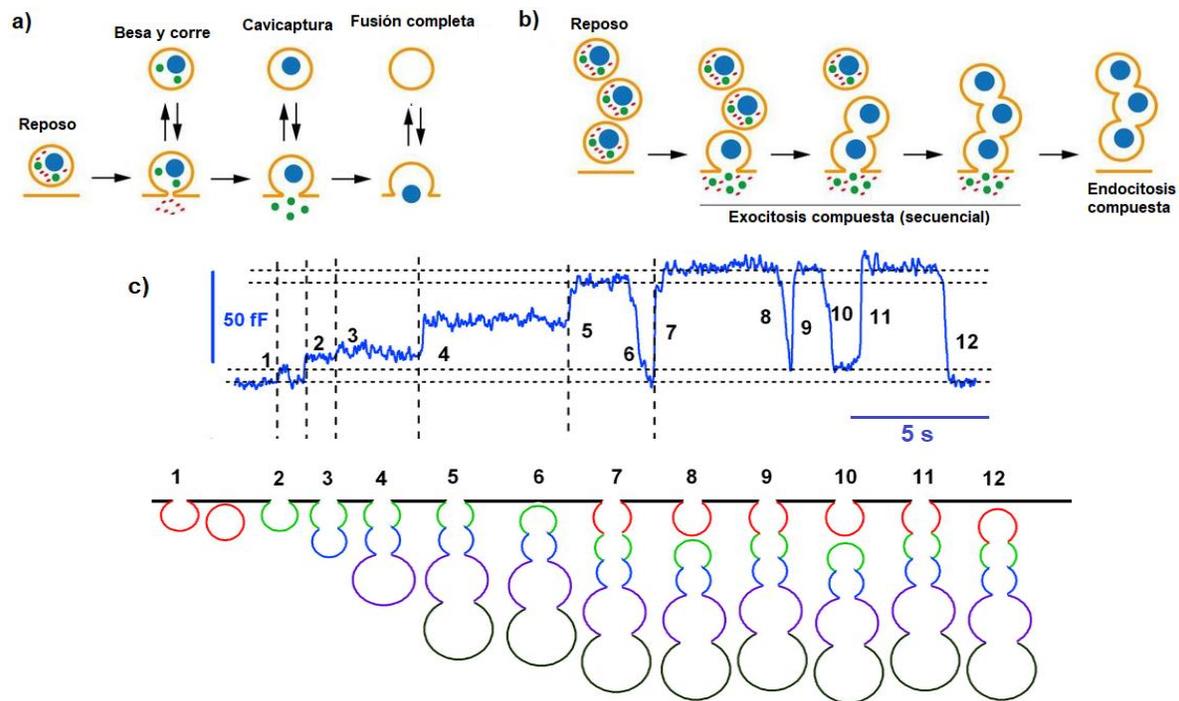


Figura 16. La exocitosis viene acompañada de varias formas de endocitosis compensatoria en células cebadas. **a)** Mecanismos de endocitosis rápida y eventos de fusión completa que ocurren durante la estimulación con antígeno en células cebadas. En el mecanismo de besa y corre, una parte del contenido granular es liberado parcialmente sin el colapso completo de la vesícula, a través de la apertura breve de un poro de fusión. En el mecanismo de cavicaptura, proteínas más grandes son retenidas en el núcleo del gránulo y algunos péptidos se liberan gracias a la dilatación de un poro de fusión más grande que en el mecanismo de besa y corre. Durante la fusión completa, las vesículas colapsan y se recuperan por mecanismos de endocitosis clásica en el que la membrana plasmática se invagina y se forma nuevamente la vesícula. **b)** Mecanismo de exo – endocitosis compuesta que ocurre durante la estimulación de células cebadas con antígeno. Ese mecanismo se caracteriza por la fusión transitoria de un pedazo grande de membrana plasmática formado por la fusión acumulativa de varios gránulos secretores que se recuperan por endocitosis compuesta. **c)** Registro de la capacitancia membranal (trazo superior en color azul), que muestra una pequeña oscilación de la capacitancia (endocitosis de besa y corre), ilustrada en el diagrama inferior (paso 1). Después, 4 eventos de fusión (pasos 2 – 5) reflejan 4 gránulos secretores que se fusionan secuencialmente con la membrana plasmática y liberan su contenido de β -hexosaminidasa. Primero, se observa la recuperación de la cavidad entera en el paso 6 que, posteriormente continúa con la

nueva fusión de una cadena de gránulos que incluyen una vesícula adicional en el paso 7 (quizá la primera vesícula que se fusionó de manera transitoria por un mecanismo de beso y corre, en color rojo). En el paso 7 – 12, el agregado de gránulos se fusionó transitoriamente por cavocaptura compuesta hasta tres veces, hasta su separación y recuperación final de la membrana plasmática en el paso 12. La cavidad tiende a crecer en el paso 11 – 12 por un flujo hacia la membrana y disminuye en los pasos 7 - 8 por la recuperación de la membrana. Además, el segundo gránulo en la cadena (en color verde) podría cerrarse en vez del primero (en color rojo), dejando al primer gránulo unido a la membrana celular como se muestra en el paso 8. Modificada a y b) de: Balseiro-Gomez, S., Flores, J. A., Acosta, J., Ramirez-Ponce, M. P., & Ales, E. (2016). Transient fusion ensures granule replenishment to enable repeated release after IgE-mediated mast cell degranulation. *Journal of Cell Science*, 129(21), 3989–4000. c) de: Cabeza, J. M., Acosta, J., & Alés, E. (2013). Mechanisms of granule membrane recapture following exocytosis in intact mast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20293–20305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459065>

8.4. Efectos de los agonistas y antagonistas del TRPV1 en la activación del FcεRI en células cebadas

En este trabajo comprobamos que el TRPV1 se abre en respuesta a la activación del FcεRI. Sin embargo, contrario a lo que esperábamos, descubrimos que ese canal no participa en la liberación de β-hexosaminidasa inducida por la activación del FcεRI. En su lugar, la activación del canal parece modular negativamente esa respuesta observada en BMMCs, pues, parece prevenir la desgranulación inducida por el FcεRI en ese tipo celular (si es que asumimos, como en otras preparaciones de CCs, que la β-hexosaminidasa se almacena en los gránulos cuyas membranas se fusionan rápidamente a la membrana celular después de un estímulo).

Investigaciones realizadas en células PMCs de ratones deficientes en el TRPV1, mostraron que ese canal no contribuye en el proceso de desgranulación dependiente del FcεRI en ese tipo celular (Solís-López et al., 2017). En ese trabajo, encontraron que el TRPV1 se expresa en PMCs pero que no es funcional, ya que el uso de capsaicina no indujo cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en las PMCs pero sí en células HEK293 que expresaron al canal y otras líneas de CCs (Bíró et al., 1998; Solís-López et al., 2017). También, encontraron que la ausencia del canal en PMCs, no inhibió el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ resultado de la estimulación del FcεRI o del MRGPRX2 (Solís-López et al., 2017). En cambio, nosotros encontramos por métodos electrofisiológicos que el TRPV1 es funcional, que se abre en respuesta a la activación del FcεRI en BMMCs y que es sensible al uso de inhibidores del canal.

En cuanto al antagonista capsazepina, notamos que ese compuesto tuvo un efecto diferencial dependiendo del protocolo utilizado y la técnica que empleamos. Nuestros datos mostraron que la capsazepina provoca la inhibición de los cambios del área de superficie celular y la corriente cuando previamente se estimula al receptor FcεRI, mientras que cuando se pre-incubó la capsazepina y se evaluó la liberación de β-hexosaminidasa activada a través del FcεRI se observó un aumento en la desgranulación. Además, ese efecto fue más evidente cuando la estimulación fue de baja intensidad, en la que la desgranulación picemal parece más relevante y no se tienen eventos de fusión de membranas discernibles (Frossi et al., 2017). Esa vía, parece activarse en CCs por la participación de la cinasa Fyn (Xiao et al., 2005).

Estudios previos han demostrado que la activación del FcεRI en CCs también provoca la activación de la vía dependiente de Fyn, la cual, no requiere de Lyn para iniciar su señalización. Además, la vía dependiente de Fyn activa a la PLCγ1, aunque en menor intensidad (Gu et al., 2001). En ese sentido, en ausencia de la cinasa Lyn, Fyn genera señales compensadoras aumentando su actividad de fosforilación, la producción de fosfatidil-inositol 3, 4, 5-trisfosfato (PIP₃, un segundo mensajero producto de la actividad de la PI₃K), y la actividad de la isoforma de PKC independiente de Lyn, la PKCδ (Parravicini et al., 2002).

Una posible explicación de la respuesta diferencial que observamos en la capsazepina es que a pesar de que puede actuar como un inhibidor potente del TRPV1 al suprimir el influjo de Ca²⁺ (B. Yang et al., 2013), también se ha encontrado que exhibe actividades no selectivas, como el antagonismo de otros canales de Ca²⁺ como los tipo L (Docherty et al., 1997) y otros ROCs (Liu & Simon, 1997). Además, la capsazepina ha demostrado inducir la entrada de Ca²⁺ a través de otro canal de la familia de los TRPs, el TRPA1 (Kistner et al., 2016), que se sabe se co-expresa con el TRPV1 en un gran conjunto de nervios sensoriales (Gouin et al., 2017). Sin embargo, en este trabajo los efectos activadores en la liberación de β-hexosaminidasa fueron confirmados por el compuesto AMG-9810, un inhibidor competitivo, más potente y selectivo del TRPV1 (Gavva et al., 2005).

Por otro lado, recientemente se demostró que la activación del TRPV1 con capsaicina inhibe la síntesis de citocinas pro-inflamatorias en una línea celular de macrófago M1 estimulados con lipopolisacárido bacteriano (Lv et al., 2021). De manera similar, el tratamiento con capsiato, el análogo no picante de la capsaicina y un activador del TRPV1 un orden de magnitud menos potente (Vriens et al., 2009), inhibió la producción de citocinas pro-inflamatorias y la fosforilación de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) en BMMCs activadas a través del receptor FcεRI (Lee et al., 2015).

Nuestros resultados apoyan los hallazgos que indican que el TRPV1 funciona como un regulador negativo de la liberación de, por lo menos, algunos mediadores en las CCs. Sin embargo, somos los primeros en reportar que ese papel inhibitor ocurre en el fenómeno de la desgranulación, ya que la síntesis de citocinas (evento analizado en otros trabajos) constituye un evento tardío de la activación de CCs. Además, que en algunos trabajos la activación de las CCs es a través de otro receptor y no del FcεRI.

Cabe destacar que la actividad de la β-hexosaminidasa (que nosotros detectamos por la escisión de su sustrato sintético, p-nitrofenil-N-acetilo glucosamina), es un parámetro que se determina para conocer el grado de desgranulación anafiláctica. Nuestros resultados en experimentos donde se pre-incuba a las BMMCs con un agonista TRPV1 (capsaicina) muestran que la pre-activación del canal antes de estimular al FcεRI previene la liberación de esa enzima, lo que indica que, aunque el canal permite la entrada de Ca²⁺, éste no contribuye a la desgranulación. Sin embargo, también podría ocurrir que, al pre-incubar a las BMMCs con capsaicina, el canal se desensibilice rápidamente y ya no podamos ver sus acciones después de estimular con el antígeno.

La determinación de la β-hexosaminidasa puede tener limitaciones para analizar el proceso de secreción de mediadores pre-formados en las BMMCs, ya que se ha reportado que al menos 86 % de la β-hexosaminidasa, puede ser liberada del contenido granular de CCs (Schwartz & Austen, 1980). Asimismo, se ha demostrado la presencia de gránulos en el interior CCs que fueron activadas a través del FcεRI

y por lo tanto pueden volver a desgranular (Liao et al., 2020). En ese sentido, se han descrito al menos 3 tipos de gránulos secretores en las CCs (Puri & Roche, 2008): uno de esos tipos de gránulos tienen otros mediadores, además de la β -hexosaminidasa (Moon et al., 2014). Otro tipo de gránulos parecen contener aproximadamente el 14 % de esa enzima y parecen ser lisosomas cuyo contenido no es secretado (Schwartz & Austen, 1980). En nuestro trabajo, nosotros solo detectamos la β -hexosaminidasa secretada y no analizamos el origen de esa enzima, por lo que se requiere más investigación para interpretar de mejor manera los resultados que hemos obtenidos. En ese contexto, sería posible que el TRPV1 contribuyera a la secreción de algunos (pero no de todos) tipos de gránulos.

8.5. Papel de la cinasa Lyn y del TRPV1 en la exocitosis activada por la estimulación del Fc ϵ RI en células cebadas.

El TRPV1, es un detector de señales polimodales que responde a una gran variedad de estímulos físicos y químicos, tanto exógenos como endógenos (Cao et al., 2013). No obstante, al igual que otros canales iónicos, es blanco de varias vías de señalización que incluyen la fosforilación y desfosforilación de sus diferentes residuos de aminoácidos (Davis et al., 2001). Esos procesos pueden regular la actividad del canal y modificar de manera importante sus propiedades electrofisiológicas tanto en células excitables como no excitables (Kumar et al., 2016). Sin embargo, las bases moleculares que conllevan tanto la integración de esas señales como al cambio o la serie de cambios conformacionales (ya sea por la simple unión de uno de sus ligandos o inducido por elementos de la señalización intracelular) y por ende, a la apertura del canal, aún no se conocen con claridad (Kwon et al., 2021).

Por otra parte, aunque se ha sugerido que la fosforilación del TRPV1 por otras cinasas como la PKC, podría directamente provocar la apertura del canal al inducir corrientes en ausencia de ligando, un estudio reportó que la modulación de la función del TRPV1 por la PKC sensibiliza al canal incrementando la corriente inducida por capsaicina, pero que no fue capaz de activar directamente al canal. Además, se ha demostrado que diferentes agonistas del TRPV1 muestran distinta

intensidad y formas de activación del canal. A su vez, la modulación del TRPV1 involucra distintos sitios de fosforilación dependiendo el mecanismo de activación del canal (Gautam et al., 2003).

En este trabajo investigamos si la activación de la cinasa Src Lyn, que se sabe inicia la señalización del receptor FcεRI, podría participar en el mecanismo de apertura del TRPV1. Sin embargo, no estudiamos si la cinasa Lyn es capaz de activar de manera directa al canal o si alguna de las moléculas o mediadores liberados como resultado del entrecruzamiento del FcεRI en CCs (por ejemplo, especies reactivas de oxígeno o mediadores lipídicos) actúan como ligandos del TRPV1.

En el presente estudio encontramos que el área de superficie celular en células (Lyn^{-/-}) aumenta como consecuencia de la activación del FcεRI y que parecido a lo observado en BMMCs WT, esos cambios son inhibidos por el bloqueo farmacológico del TRPV1, lo que no se había reportado previamente. Lo anterior, sugiere una participación de esa cinasa en la apertura de canales de Ca²⁺ membranales como el TRPV1, pero no en los cambios del área de superficie celular relacionados con la exocitosis de esas células. Ese resultado coincide con lo reportado en otros trabajos, que demuestran que las células que no expresan a Lyn hiper-desgranulan (Hernandez-Hansen et al., 2004; Parravicini et al., 2002), o presentan una desgranulación normal (Nishizumi & Yamamoto, 1997), implicando que Lyn no participa en la desgranulación anafiláctica. En cambio, se ha reportado que la cinasa Fyn si es necesaria para la desgranulación de CCs y que inicia señales complementarias que no dependen de Lyn (Parravicini et al., 2002).

Cultivos de BMMCs producidas a partir de ratones Fyn^{-/-} revelaron que esas células no pueden desgranular completamente después del entrecruzamiento del FcεRI debido a una entrada defectuosa de Ca²⁺ extracelular, pero que conservan una entrada de Ca²⁺ SOCE normal. En ese trabajo, se demostró que los canales afectados en las BMMCs Fyn^{-/-} tenían un perfil compatible con los canales TRPCs, los cuales, fueron capaces de interactuar con la cinasa Fyn (Sanchez-Miranda et al., 2010). Sin embargo, en este estudio no analizamos si la cinasa Fyn participa en la apertura del canal TRPV1 dependiente de la activación del FcεRI en CCs.

En ese sentido, el estudio electrofisiológico de CCs peritoneales reveló que la Cm experimenta breves fluctuaciones que aparecen repetitivamente en ausencia Ca^{2+} extracelular. Esos aumentos y descensos en la Cm, se asociaron con aumentos transitorios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que se deben a la liberación y la subsecuente re-accumulación de Ca^{2+} por las pozas intracelulares (Almers & Neher, 1987). Lo anterior, indica que el Ca^{2+} proveniente de la SOCE es suficiente para iniciar los procesos de exocitosis en CCs. Además, investigaciones realizadas en BMMCs y macrófagos de peritoneo provenientes de ratones que carecen de la cinasa Lyn revelaron que presentan una disminución importante en la expresión de canales TRPC4 (Hernandez-Hansen et al., 2004), mientras que otras investigaciones demostraron que la fosforilación del residuo Y200 en el TRPV1 por la cinasa Src aumenta su inserción en la membrana celular (Xuming Zhang et al., 2005). Lo anterior sugiere que canales de la familia de TRPs participan en la entrada de Ca^{2+} extracelular necesaria para lograr la desgranulación y la síntesis de citocinas en CCs posiblemente a través de un mecanismo SOCE y no-SOCE.

Adicionalmente, notamos que el efecto de la capsazepina en la Cm parece más evidente en ausencia de Lyn. Aunque es necesario aumentar el tamaño de la muestra, este hallazgo podría deberse a una menor expresión de canales TRPV1 y a los efectos no selectivos de la capsazepina o a que el canal TRPV1 también participe en la entrada de Ca^{2+} por un mecanismo SOCE y ROCE.

8.6. Papel de la cinasa Lyn en la movilización de calcio en células cebadas activadas a través del receptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$

Finalmente, en este estudio observamos mediante técnicas electrofisiológicas que, en ausencia de Lyn, la movilización de Ca^{2+} total a través de canales de membrana está afectada y esto se parece a lo observado en la inhibición de la corriente por el bloqueo farmacológico del canal TRPV1 en células WT estimuladas a través del $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ (ver figuras 9a, b y 15a, b). Además, encontramos que las BMMCs deficientes en Lyn presentan un retraso en la movilización de Ca^{2+} membranal que podría corresponder a la apertura canales SOCs.

Lo anterior también concuerda con investigaciones previas que demuestran que las BMMCs Lyn^{-/-} activadas a través del FcεRI, presentan una movilización de Ca²⁺ defectuosa y retrasada, consistente con una activación más lenta de la PLCγ y mostrando una afectación parcial de la SOCE (Hernandez-Hansen et al., 2004; Nishizumi & Yamamoto, 1997; Parravicini et al., 2002). Por lo tanto, una entrada de Ca²⁺ a través de otros canales no regulados por Lyn podría ser suficiente para permitir la desgranulación y otros eventos dependientes del Ca²⁺ en CCs.

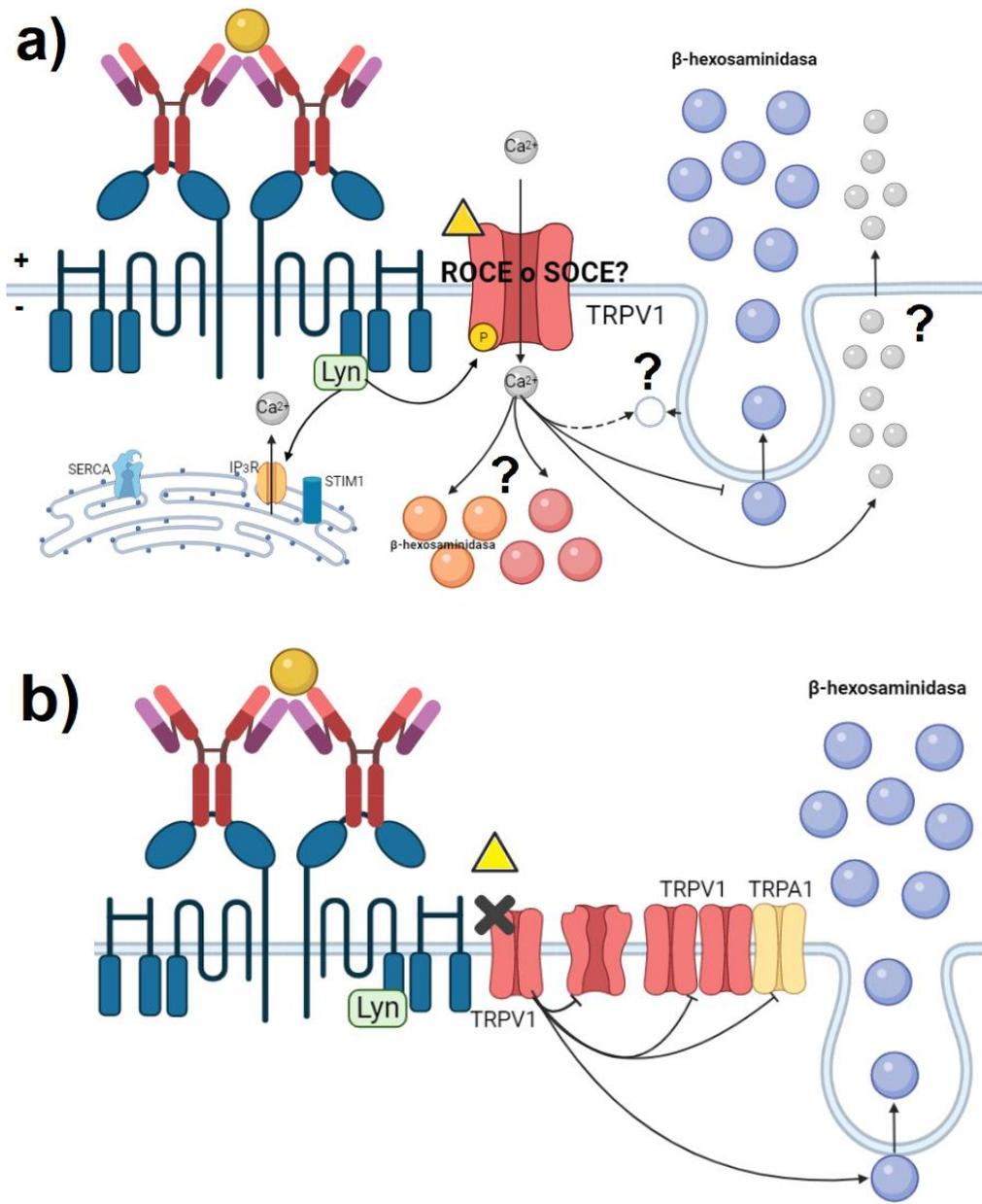


Figura 17. Efectos de la apertura del TRPV1 en respuesta a la activación del FcεRI en BMMCs de ratón. **a)** El entrecruzamiento del FcεRI en la membrana de células cebadas activa a la cinasa Lyn, la cual participa parcialmente en el vaciamiento de pozas intracelulares de calcio y modula la apertura de canales de membrana. Esa cinasa, podría fosforilar regiones citoplasmáticas del canal TRPV1 provocando o facilitando su apertura y el influjo de calcio extracelular. Además, el potencial de membrana negativo encontrado en esas células, ejerce un papel importante al modular la fuerza impulsora para la entrada de calcio. El calcio aportado por el TRPV1, modula vías que participan en los eventos de fusión membranal que ocurren durante la exocitosis, de modo que, participa de manera diferencial en la liberación de mediadores preformados. Por un lado, regula negativamente la desgranulación y la liberación de β-hexosaminidasa contenida en mayor cantidad en un tipo de gránulos grandes (esferas en color azul) mientras que podría permitir la liberación de pequeñas vesículas a través de otras formas de exocitosis (como por exocitosis constitutiva: esferas color gris o desgranulación picemal: no mostrada en este esquema) o la liberación de otros tipos de gránulos que no tienen β-hexosaminidasa (esferas en color rojo) o que contienen poca β-hexosaminidasa y otros mediadores (esferas color naranja). A su vez, otro posible mecanismo mediante el cual el TRPV1 podría regular negativamente la desgranulación es a través del reciclaje vesicular (vesícula vacía). **b)** El bloqueo farmacológico del TRPV1 en células cebadas activadas a través del FcεRI podría tener efectos deletéreos al promover la desgranulación y la liberación de β-hexosaminidasa en un mecanismo independiente del calcio. Ese mecanismo, puede ocurrir al evitar modificaciones post-traduccionales que llevan al cambio conformacional y a la apertura del canal, así como al impedir la formación de complejos del TRPV1 en la membrana o del TPV1 con otros TRPs como el TRPA1 por ejemplo.

9. Conclusiones

- 1) La activación del receptor FcεRI ocasiona la apertura del canal TRPV1 en células BMDCs.
- 2) El canal TRPV1 contribuye a la entrada de calcio extracelular y, cuando se activa previamente a la estimulación con complejos IgE/Ag, es un regulador negativo de la secreción de β-hexosaminidasa inducida por el FcεRI.
- 3) La cinasa Lyn participa en la generación de corrientes de calcio en la membrana plasmática de las BMDCs en respuesta a la activación del FcεRI.

10. Perspectivas

- 1) Caracterizar la corriente inducida por la activación del TRPV1 con capsaicina en BMMCs mediante electrofisiología.
- 2) Aislar la corriente de Ca^{2+} dependiente del TRPV1 por la activación del FcεRI mediante electrofisiología y reemplazando el Ca^{2+} por Ba^{2+} o Sr^{2+} en la solución de registro extracelular.
- 3) Determinar si el mecanismo de entrada de Ca^{2+} mediado por el TRPV1 en respuesta al entrecruzamiento del FcεRI es de tipo SOCE o ROCE con ayuda de herramientas farmacológicas como la tapsigargina y un medio libre de calcio usando métodos flurométricos o utilizando métodos electrofisiológicos añadiendo un exceso de un quelante de calcio en la solución intracelular y un exceso de Ca^{2+} extracelular.
- 4) Investigar la expresión del TRPV1 en células deficientes en Lyn mediante RT-PCR, Western Blot o inmunofluorescencia.
- 5) Analizar la interacción de Lyn y el TRPV1 en respuesta a la activación del FcεRI mediante ensayos de co-inmunoprecipitación o co-localización por inmunofluorescencia.
- 6) Explorar el papel de la cinasa Fyn en la activación del TRPV1 dependiente del FcεRI utilizando BMMCs deficientes en Fyn.
- 7) Estudiar la participación del TRPV1 en liberación de citocinas pro y anti-inflamatorias estimuladas por el FcεRI por análisis de expresión del ARN mensajero de citocinas mediante RT-PCR y la detección de citocinas en suero en un modelo *in vivo* de anafilaxia.
- 8) Investigar el mecanismo implicado en la inhibición de la desgranulación mediada por el TRPV1 analizando cambios en moléculas implicadas en la regulación de los re-arreglos del citoesqueleto como las coroninas 1A y 1B o los cambios en actina mediante Western Blot o inmunofluorescencia.
- 9) Investigar otros mecanismos implicados en la apertura del TRPV1 después de la activación del FcεRI como la producción de especies reactivas de oxígeno.

11. Anexos

Calculate Junction Potentials

Whole-cell measurements

$V_m = V_p - V_L'$

Experimental Parameters

Ref. electrode: Standard salt-solution electrode.
Temperature (°C): 22.0

Ion	z	u	Cpip	Cbath
Na	1	0.682	10	140
Mg	2	0.361	1	2
K	1	1	0	2.8
HEPES	-1	0.3	10	10
gluc	-1	0.33	0	5.6
Ca	2	0.4048	0.1	2
Cs	1	1.05	140	0
Cl	-1	1.0388	4	115

Charge Balance: 136 20.2

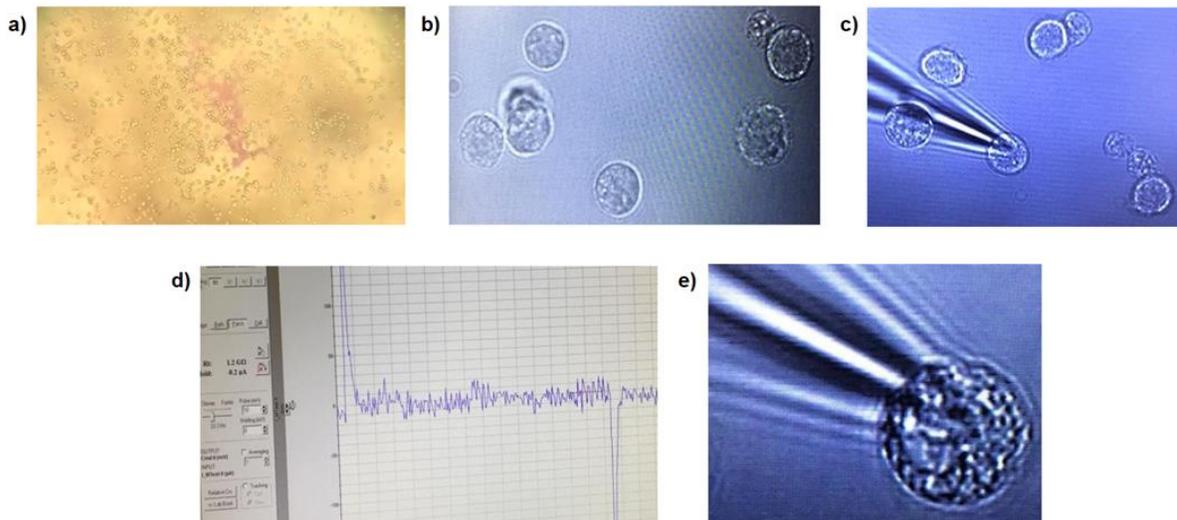
Add... Edit... Delete Delete All

Results

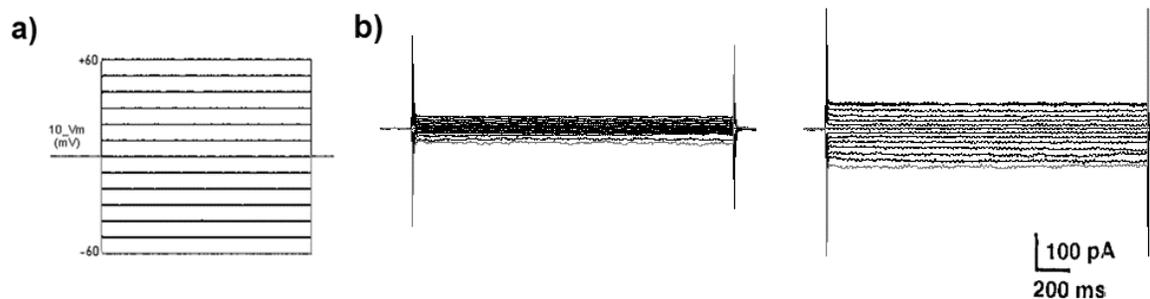
Junction Pot. (original solution - pipette) = 22.2 mV at 22.0 °C.
Therefore, $V_m = V_p - (22.2) \text{ mV}$

New Bath Solution Old Bath Solution New Experiment...

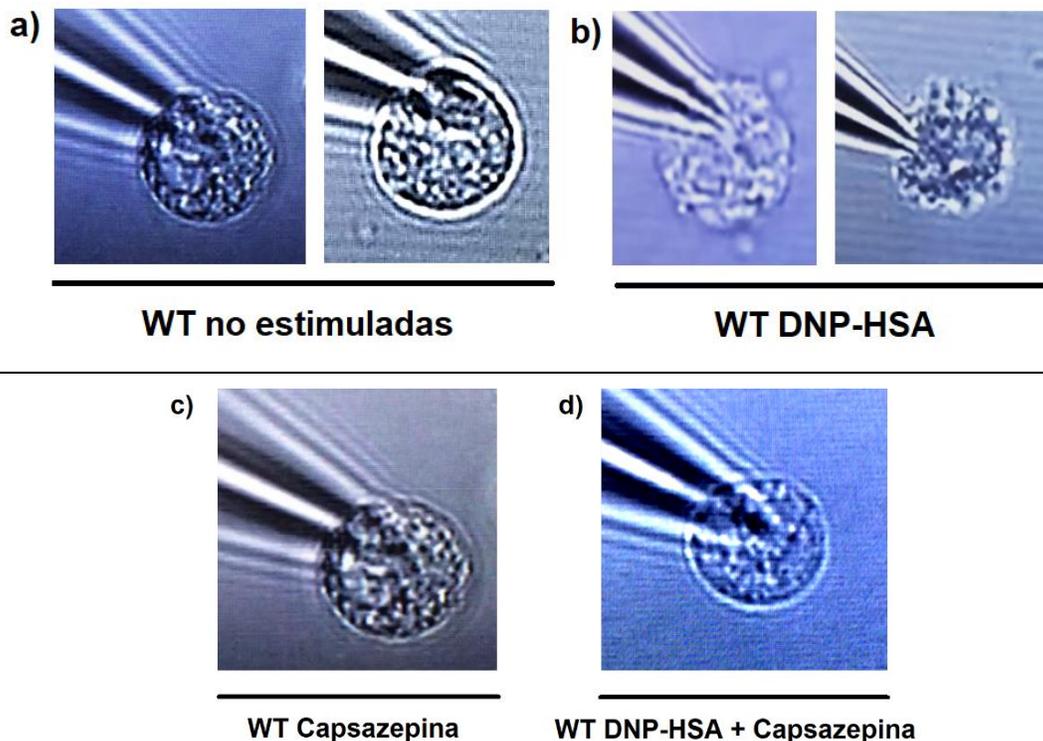
Anexo 1. Cálculo del potencial de *unión-líquida*. Se utilizó el software clampex 11.1 molecular devices (patch-clamp measurements, whole cell, standard salt-solution electrode).



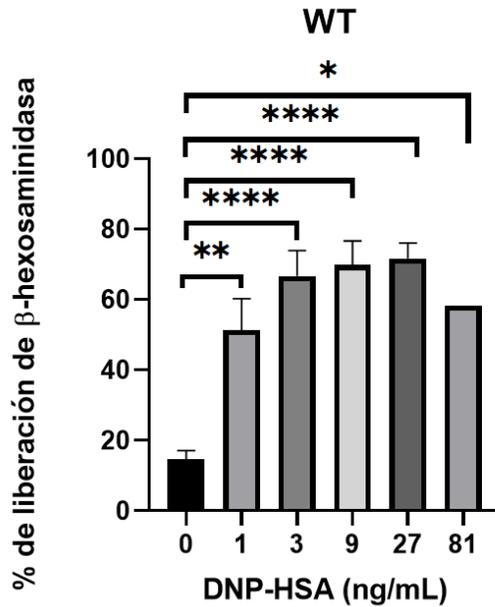
Anexo 2. Estandarización de la técnica de Patch-Clamp en BMMCs. **a)** Células observadas a través del microscopio Nikon Eclipse, objetivo 10X. **b)** Visualización de células individuales desde la pantalla conectada a la cámara infrarroja de interferencia con el objetivo de inmersión 40X. **c)** Contacto de la pipeta de registro con la BMMC seleccionada. **d)** Formación del giga-sello membranar. **e)** Acercamiento de una BMMC durante el registro electrofisiológico mostrando sus gránulos citoplasmáticos.



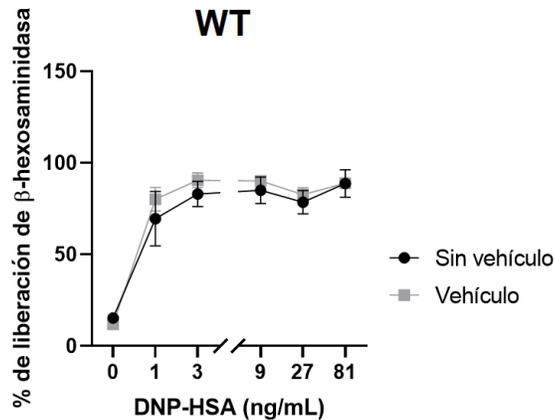
Anexo 3. Corrientes observadas en BMMCs WT. Usando la técnica de patch-clamp, en la configuración de célula completa en fijación de voltaje, (n=5). **a)** Se aplicó un protocolo de pulsos de voltaje despolarizantes de 200 ms de duración, desde - 60 a + 60 mV con incrementos de 10 mV, desde un potencial fijo de -20 mV. **b)** Registro representativo de dos BMMCs WT que presentan una combinación de corriente entrante con corriente saliente en el estado basal.



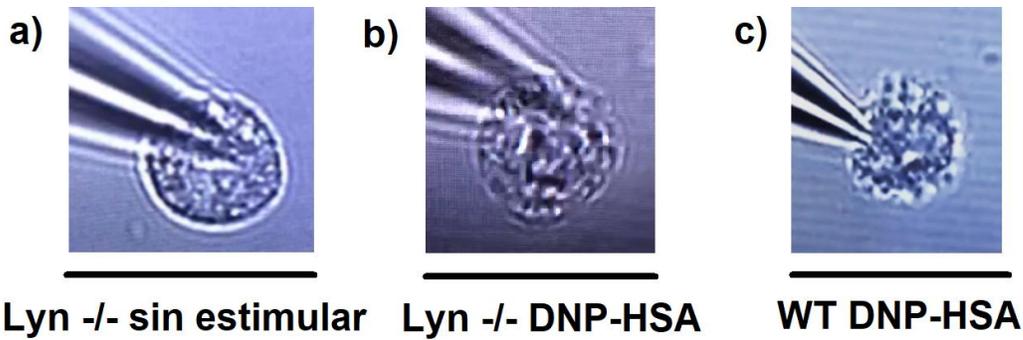
Anexo 4. Comparación visual de las BMMCs WT durante el registro electrofisiológico. Acercamiento de BMMCs WT representativas, observadas a través de la pantalla conectada a la cámara infrarroja de interferencia acoplada al microscopio Nikon Eclipse FN-S2N con el objetivo de inmersión 40X. **a)** Imagen de dos BMMCs no estimuladas que muestran abundantes gránulos citoplasmáticos, membrana celular continua y regular. **b)** Izquierda: imagen de BMMC registrada durante la estimulación con antígeno que muestra irregularidad de la membrana celular y pequeños abombamientos, así como la expulsión de algunos paquetes de heparán sulfato. Derecha: imagen de BMMC registrada durante la desgranulación en respuesta al antígeno, mostrando expulsión del contenido granular a la proximidad, irregularidad de la membrana celular y disminución importante de los gránulos contenidos en el citoplasma, sin agotar completamente el contenido granular citoplasmático. **c)** Imagen de BMMC no estimulada en presencia de capsazepina. **d)** Imagen de BMMC estimulada en presencia de capsazepina.



Anexo 5. Ensayo de funcionalidad de BMMCs WT de ratón. Se midió el porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa por espectrofotometría en BMMCs WT (n=5), estimuladas con diferentes concentraciones de DNP-HSA (0, 1, 3, 9, 27, 81 ng / mL) por 60 minutos. La gráfica muestra la media \pm S.E.M. (ANOVA de una vía, * p < 0.05, ** p < 0.01; **** p < 0.0001, seguido de la prueba post-hoc de Dunnett).



Anexo 6. Comparación del vehículo con la respuesta obtenida de la estimulación dependiente del Fc ϵ RI en BMMCs WT de ratón. Ensayo de desgranulación utilizando BMMCs WT (n=2), preincubadas por 15 minutos con el vehículo DMSO al 0.001%. Se estimuló con DNP-HSA a diferentes concentraciones (0, 1, 3, 9, 27, 81 ng / mL) por 60 minutos y se cuantificó el porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa. No se encontraron diferencias significativas entre la respuesta obtenida del vehículo + DNP-HSA, con la del DNP-HSA solo. La gráfica muestra la media \pm S.E.M. (ANOVA de una vía, seguido de la prueba post-hoc de Dunnett).



Anexo 7. Comparación visual de las BMMCs Lyn -/- y WT de ratón durante el registro electrofisiológico. Acercamiento de BMMCs representativas, observadas a través de la pantalla conectada a la cámara infrarroja de interferencia acoplada al microscopio Nikon Eclipse FN-S2N con el objetivo de inmersión 40X. **a)** Imagen de BMMC Lyn -/- no estimulada, que muestra abundantes gránulos citoplasmáticos, membrana celular continua y regular. **b)** Imagen de BMMC Lyn -/- registrada durante la estimulación con antígeno que muestra cambios en la posición de los gránulos citoplasmático, pequeños abombamientos de la membrana celular, sin perder su regularidad, ni su forma y un ligero aumento en el tamaño celular. **c)** Imagen de BMMC WT registrada posterior a la desgranulación en respuesta al antígeno, mostrando la expulsión del contenido granular a la proximidad, irregularidad de la membrana celular, disminución del tamaño celular y disminución importante de los gránulos contenidos en el citoplasma.

12. Material suplementario

Video adjunto a la presente tesis que muestra a las células cebadas derivadas de médula ósea (BMMCs) de tipo silvestre (WT) y deficientes en la cinasa Lyn (Lyn -/-) durante el registro electrofisiológico de corrientes iónicas en respuesta a distintos tratamientos. Los videos fueron grabados utilizando un microscopio Nikon Eclipse FN-S2N (Nikon, Tokio), acoplado a una cámara infrarroja de contraste de interferencia, con un objetivo de inmersión 40X.

13. Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology* (Issue 9). Elsevier.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., & Chánez Cárdenas, M. E. (2015). Herramientas moleculares aplicadas en ecología. PCR en tiempo real. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología*, 13(3), 175–202.
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pctiempo.pdf>
- Almers, W., & Neher, E. (1987). Gradual and stepwise changes in the membrane capacitance of rat peritoneal mast cells. *The Journal of Physiology*, 386(1), 205–217. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016530>
- Armstrong, D. L., Erxleben, C., & White, J. A. (2010). Chapter 7 - Patch Clamp Methods for Studying Calcium Channels. In M. B. T.-M. in C. B. Whitaker (Ed.), *Calcium in Living Cells* (Vol. 99, pp. 183–197). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374841-6.00007-4>
- Ashmole, I., & Bradding, P. (2013). Ion channels regulating mast cell biology. *Clinical and Experimental Allergy*, 43(5), 491–502.
<https://doi.org/10.1111/cea.12043>
- Ashmole, Ian, Duffy, S. M., Leyland, M. L., Morrison, V. S., Begg, M., & Bradding, P. (2012). CRACM/Orai ion channel expression and function in human lung mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(6), 1628-1635.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.070>
- Bankova, L. G., Dwyer, D. F., Liu, A. Y., Austen, K. F., & Gurish, M. F. (2014). Maturation of mast cell progenitors to mucosal mast cells during allergic pulmonary inflammation in mice. *Mucosal Immunology*, 8(3), 596–606.
<https://doi.org/10.1038/mi.2014.91>
- Barrie, P., & Bvsc, H. (1996). *Immunological and Electrophysiological Studies of Rat Bone Marrow-Derived Mast Cells*.
- Beider, K., Rosenberg, E., Dimenshtein-Voevoda, V., Sirovsky, Y., Vladimirovsky, J., Magen, H., Ostrovsky, O., Shimoni, A., Bromberg, Z., Weiss, L., Peled, A., & Nagler, A. (2020). Blocking of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) promotes terminal mitophagy in multiple myeloma, disturbing calcium homeostasis and targeting ubiquitin pathway and bortezomib-induced unfolded protein response. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 158.
<https://doi.org/10.1186/s13045-020-00993-0>
- Berridge, M. J. (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem. J.*, 312, 1–11.
<https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1998.13.4.157>
- Berridge, M. J. (2014a). Module 11: Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death. In *Cell Signalling Biology* (Vol. 6, p. csb0001011). Portland Press Limited. <https://doi.org/10.1042/csb0001011>
- Berridge, M. J. (2014b). Module 2: Cell Signalling Pathways. *Cell Signalling Biology*, 6, csb0001002. <https://doi.org/10.1042/csb0001002>
- Berridge, M. J. (2014c). Module 3: Ion Channels. *Cell Signalling Biology*, 6, csb0001003. <https://doi.org/10.1042/csb0001003>
- Berridge, M. J. (2014d). Module 4: Sensors and Effectors. *Cell Signalling Biology*,

- 6, csb0001004. <https://doi.org/10.1042/csb0001004>
- Bevan, S., Quallo, T., Andersson, D. A. and, Zygmunt, P. M., & Högestätt, E. D. (2014). Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: TRPV1. In B. Nilius & V. Flockerzi (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology: Vol. 1* (pp. 207–234, 583–614). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_3
- Bíró, T., Maurer, M., Modarres, S., Lewin, N. E., Brodie, C., Ács, G., Ács, P., Paus, R., & Blumberg, P. M. (1998). Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood*, *91*(4), 1332–1340. <https://doi.org/10.1182/blood.v91.4.1332>
- Blank, U. (2011). The mechanisms of exocytosis in mast cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *716*, 107–122. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9533-9_7
- Blank, U., Cyprien, B., Martin-Verdeaux, S., Paumet, F., Pombo, I., Rivera, J., Roa, M., & Varin-Blank, N. (2002). SNAREs and associated regulators in the control of exocytosis in the RBL-2H3 mast cell line. *Molecular Immunology*, *38*(16–18), 1341–1345. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(02\)00085-8](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(02)00085-8)
- Blank, U., Madera-Salcedo, I. K., Danelli, L., Claver, J., Tiwari, N., Sánchez-Miranda, E., Vázquez-Victorio, G., Ramírez-Valadez, K. A., Macias-Silva, M., & González-Espinosa, C. (2014). Vesicular trafficking and signaling for cytokine and chemokine secretion in mast cells. *Frontiers in Immunology*, *5*(SEP), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00453>
- Bödding, M., & Penner, R. (1999). Differential modulation of voltage-dependent Ca²⁺ currents by EGTA and BAPTA in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *439*(1–2), 27–38. <https://doi.org/10.1007/s004249900158>
- Bonnington, J. K., & McNaughton, P. A. (2003). Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *Journal of Physiology*, *551*(2), 433–446. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.039990>
- Bouron, A., Kiselyov, K., & Oberwinkler, J. (2015). Permeation, regulation and control of expression of TRP channels by trace metal ions. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *467*(6), 1143–1164. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1590-3>
- Brito, R., Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L., & Ramkumar, V. (2014). TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells*, *3*(2), 517–545. <https://doi.org/10.3390/cells3020517>
- Buño, W., & Araque, A. (2006). Propiedades eléctricas de las células excitables. *Viguera*, 147–173. <http://www.anep.edu.uy/ipa-fisica/document/material/primero/2008/espacio/propelec.pdf>
- Cabeza, J. M., Acosta, J., & Alés, E. (2013). Mechanisms of granule membrane recapture following exocytosis in intact mast cells. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(28), 20293–20305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459065>
- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., & Julius, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, *504*(7478), 113–118. <https://doi.org/10.1038/nature12823>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the

- pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Chang, W. C. (2006). Store-operated calcium channels and pro-inflammatory signals. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(7), 813–820. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00395.x>
- Chelombitko, M. A., Chernyak, B. V., Fedorov, A. V., Zinovkin, R. A., & Lakshmi, B. (2020). The role played by mitochondria in FcεRI-dependent mast cell activation. *Frontiers in Immunology*, 22.
- Chen, Y. C., Chang, Y. C., Chang, H. A., Lin, Y. S., Tsao, C. W., Shen, M. R., & Chiu, W. T. (2017). Differential Ca²⁺ mobilization and mast cell degranulation by FcεRI- and GPCR-mediated signaling. *Cell Calcium*, 67, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.08.002>
- Chrysaftides, S. M., Bordes, S., & Sharma, S. (2022). *Physiology, Resting Potential*.
- Conforti, L. (2012). *Chapter 20 - Patch-Clamp Techniques* (N. B. T.-C. P. S. B. (Fourth E. Sperelakis (ed.); pp. 369–381). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00020-2>
- Craig, S. S., & Schwartz, L. B. (1989). Tryptase and chymase, markers of distinct types of human mast cells. *Immunologic Research*, 8(2), 130–148. <https://doi.org/10.1007/BF02919075>
- Davis, M. J., Wu, X., Nurkiewicz, T. R., Kawasaki, J., Gui, P., Hill, M. A., & Wilson, E. (2001). Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 281(5), H1835–H1862. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.5.H1835>
- Docherty, R. J., Yeats, J. C., & Piper, A. S. (1997). Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *British Journal of Pharmacology*, 121(7), 1461–1467. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701272>
- Dudeck, A., Köberle, M., Goldmann, O., Meyer, N., Dudeck, J., Lemmens, S., Rohde, M., Roldán, N. G., Dietze-Schwonberg, K., Orinska, Z., Medina, E., Hendrix, S., Metz, M., Zenclussen, A. C., von Stebut, E., & Biedermann, T. (2019). Mast cells as protectors of health. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 144(4), S4–S18. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.054>
- Duffy, S. M., Ashmole, I., Smallwood, D. T., Leyland, M. L., & Bradding, P. (2015). Orai/CRACM1 and KCa3.1 ion channels interact in the human lung mast cell plasma membrane. *Cell Communication and Signaling*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0112-z>
- Duffy, S. M., Lawley, W. J., Conley, E. C., & Bradding, P. (2001). Resting and Activation-Dependent Ion Channels in Human Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4261–4270. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4261>
- Duitama, M., Vargas-López, V., Casas, Z., Albarracín, S. L., Sutachan, J.-J., & Torres, Y. P. (2020). TRP Channels Role in Pain Associated With Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 14(August), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00782>
- Dwyer, D. F., Barrett, N. A., Austen, K. F., Kim, E. Y., Brenner, M. B., Shaw, L., Yu, B., Goldrath, A., Mostafavi, S., Regev, A., Rhoades, A., Moodley, D., Yoshida, H., Mathis, D., Benoist, C., Nabekura, T., Lam, V., Lanier, L. L., Brown, B., ... Colonna, M. (2016). Expression profiling of constitutive mast cells reveals a

- unique identity within the immune system. *Nature Immunology*, 17(7), 878–887. <https://doi.org/10.1038/ni.3445>
- Elieh Ali Komi, D., Wöhrl, S., & Bielory, L. (2020). Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 58(3), 342–365. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08769-2>
- Fahrner, M., Derler, I., Jardin, I., & Romanin, C. (2013). The STIM1/Orai signaling machinery. *Channels (Austin, Tex.)*, 7(5), 330–343. <https://doi.org/10.4161/chan.26742>
- Fasolato, C., Hoth, M., Matthews, G., & Penner, R. (1993). Ca²⁺ and Mn²⁺ influx through receptor-mediated activation of nonspecific cation channels in mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), 3068–3072. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.3068>
- Fernandez, J. M., Lindau, M., & Eckstein, F. (1987). Intracellular stimulation of mast cells with guanine nucleotides mimic antigenic stimulation. *FEBS Letters*, 216(1), 89–93. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80762-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80762-7)
- Fernandez, J. M., Neher, E., & Gomperts, B. D. (1984). Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature*, 312(5993), 453–455. <https://doi.org/10.1038/312453a0>
- Feske, S., Concepcion, A. R., & Coetzee, W. A. (2019). *Eye on ion channels in immune cells*. 8014(March), 8–11.
- Feske, S., Wulff, H., & Skolnik, E. Y. (2015). *Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112212>
- Freichel, M., Almering, J., & Tsvilovskyy, V. (2012). The role of TRP proteins in mast cells. *Frontiers in Immunology*, 3(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00150>
- Friis, U. G., Praetorius, H. A., Knudsen, T., & Johansen, T. (1997). Role of the Na⁺/K⁺-ATPase in regulating the membrane potential in rat peritoneal mast cells. *British Journal of Pharmacology*, 122(4), 599–604. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701414>
- Froghi, S., Grant, C. R., Tandon, R., Quaglia, A., Davidson, B., & Fuller, B. (2021). New Insights on the Role of TRP Channels in Calcium Signalling and Immunomodulation: Review of Pathways and Implications for Clinical Practice. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08824-3>
- 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. <https://doi.org/10.1111/imr.12636>
- Frossi, B., Mion, F., Tripodo, C., Colombo, M. P., & Pucillo, C. E. (2017). Rheostatic Functions of Mast Cells in the Control of Innate and Adaptive Immune Responses. *Trends in Immunology*, 38(9), 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.001>
- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, 12(11), 1035–1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>
- Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M. M., & Tsai, M. (2005). Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory

- cells: Recent advances. *Annual Review of Immunology*, 23, 749–786.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025>
- Gautam, B., Hui-Juan, H., S., G. K., Weiguo, Z., Haibin, W., J., B. D., S., O. G., & W., G. R. (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12480–12485.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2032100100>
- Gavva, N. R., Tamir, R., Qu, Y., Klionsky, L., Zhang, T. J., Immke, D., Wang, J., Zhu, D., Vanderah, T. W., Porreca, F., Doherty, E. M., Norman, M. H., Wild, K. D., Bannon, A. W., Louis, J. C., & Treanor, J. J. S. (2005). AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(1), 474–484.
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.079855>
- Gees, M., Colsoul, B., & Nilius, B. (2010). *The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling*. 1–31.
- Gentek, R., Ghigo, C., Hoeffel, G., Bulle, M. J., Msallam, R., Gautier, G., Launay, P., Chen, J., Ginhoux, F., & Bajénoff, M. (2018). Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity*, 48(6), 1160-1171.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.025>
- Gilfillan, A., Austin, J. S., & Metcalfe, D. (2011). MAST CELL BIOLOGY: Introduction and Overview. In A. Gilfillan & D. Metcalfe (Eds.), *Mast Cell Biology* (716th ed., pp. 2–12). Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC.
- Gilfillan, A. M., & Beaven, M. A. (2011). Regulation of mast cell responses in health and disease. *Critical Reviews in Immunology*, 31(6), 475–530.
<https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v31.i6.30>
- Gilfillan, A. M., & Tkaczyk, C. (2006). Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), 218–230.
<https://doi.org/10.1038/nri1782>
- Gillespie, J. I., & Denton, E. J. (1979). The effect of repetitive stimulation on the passive electrical properties of the presynaptic terminal of the squid giant synapse. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 206(1164), 293–306. <https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0106>
- Gomez, G., Gonzalez-Espinosa, C., Odom, S., Baez, G., Cid, M. E., Ryan, J. J., & Rivera, J. (2005). Impaired FcεRI-Dependent Gene Expression and Defective Eicosanoid and Cytokine Production as a Consequence of Fyn Deficiency in Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 175(11), 7602–7610.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7602>
- Gouin, O., L’Herondelle, K., Lebonvallet, N., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J. L., Lefevre, L., Misery, L., & Le Garrec, R. (2017). TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein and Cell*, 8(9), 644–661. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5>
- Gri, G., Frossi, B., D’Inca, F., Danelli, L., Betto, E., Mion, F., Sibilano, R., & Pucillo, C. (2012). Mast cell: An emerging partner in immune interaction. *Frontiers in*

- Immunology*, 3(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00120>
- Gu, H., Saito, K., Klaman, L. D., Shen, J., Fleming, T., Wang, Y., Pratt, J. C., Lin, G., Lim, B., Kinet, J. P., & Neel, B. G. (2001). Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature*, 412(6843), 186–190. <https://doi.org/10.1038/35084076>
- Gurish, M. F., & Austen, K. F. (2012). Developmental Origin and Functional Specialization of Mast Cell Subsets. *Immunity*, 37(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.003>
- Gurish, M. F., & Boyce, J. A. (2006). Mast cells : Ontogeny , homing , and recruitment of a unique innate effector cell. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(6), 1285–1291. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.04.017>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *European Journal of Physiology*, 309, 106–122. <https://doi.org/10.1007/bf00656997>
- Helander, H. F., & Bloom, G. D. (1974). Quantitative analysis of mast cell structure. *Journal of Microscopy*, 100(3), 315–321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1974.tb03943.x>
- Hellmich, U. A., & Gaudet, R. (2014). Structural biology of TRP channels. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 223, 963–990. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05161-1_10
- Hernandez-Hansen, V., Smith, A. J., Surviladze, Z., Chigaev, A., Mazel, T., Kalesnikoff, J., Lowell, C. A., Krystal, G., Sklar, L. A., Wilson, B. S., & Oliver, J. M. (2004). Dysregulated FcεRI Signaling and Altered Fyn and SHIP Activities in Lyn-Deficient Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 173(1), 100–112. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.100>
- Hill, C. L., & Stephens, G. J. (2021). An Introduction to Patch Clamp Recording. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2188, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0818-0_1
- Hill, P. B., Martin, R. J., & Miller, H. R. P. (1996). Characterization of whole-cell currents in mucosal and connective tissue rat mast cells using amphotericin-B-perforated patches and temperature control. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 432(6), 986–994. <https://doi.org/10.1007/s004240050226>
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes and Development*, 17(18), 2205–2232. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>
- Hoth, M., Fasolato, C., & Penner, R. (1993). Ion Channels and Calcium Signaling in Mast Cells. *ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 707, 13. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb38053>
- Hoth, M., & Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355(6358), 353–356. <https://doi.org/10.1038/355353a0>
- Jaffe, L. A., Hagiwara, S., & Kado, R. T. (1978). The time course of cortical vesicle fusion in sea urchin eggs observed as membrane capacitance changes. *Developmental Biology*, 67(1), 243–248. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0012-1606\(78\)90314-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0012-1606(78)90314-7)
- Jiménez-Andrade, G. Y., Ibarra-Sánchez, A., González, D., Lamas, M., &

- González-Espinosa, C. (2013). Immunoglobulin e induces VEGF production in mast cells and potentiates their pro-tumorigenic actions through a Fyn kinase-dependent mechanism. *Journal of Hematology and Oncology*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-56>
- Jiménez, M., Cervantes-García, D., Córdova-Dávalos, L. E., Pérez-Rodríguez, M. J., Gonzalez-Espinosa, C., & Salinas, E. (2021). Responses of Mast Cells to Pathogens: Beneficial and Detrimental Roles. *Frontiers in Immunology*, 12(June), 1–31. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.685865>
- Jin, X., Morsy, N., Winston, J., Pasricha, P. J., Garrett, K., & Akbarali, H. I. (2004). Modulation of TRPV1 by nonreceptor tyrosine kinase, c-Src kinase. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287(2 56-2), 558–563. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00113.2004>
- Joshi, C., & Fernandez, J. M. (1988). Capacitance Measurements: An Analysis of the Phase Detector Technique Used to Study Exocytosis and Endocytosis. *Biophysical Journal*, 53(June), 885–892.
- Kadir, L. A., Stacey, M., & Barrett-Jolley, R. (2018). Emerging roles of the membrane potential: Action beyond the action potential. *Frontiers in Physiology*, 9(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01661>
- Kalia, J., & Swartz, K. J. (2013). Exploring structure-function relationships between TRP and Kv channels. *Scientific Reports*, 3(1), 1523. <https://doi.org/10.1038/srep01523>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (2014). Membrane Potential and the Passive Electrical Properties of the Neuron. In *Principles of Neural Science, Fifth Edition* (5th ed.). McGraw-Hill Education. <http://neurology.mhmedical.com/content.aspx?aid=1101677543>
- Kanner, B. I., & Metzger, H. (1983). Crosslinking of the receptors for immunoglobulin E depolarizes the plasma membrane of rat basophilic leukemia cells. Kanner, B. I., & Metzger, H. (1983). Crosslinking of the receptors for immunoglobulin E depolarizes the plasma membrane of rat basophilic I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(18), 5744–5748. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.18.5744>
- Kanner, B. I., & Metzger, H. (1984). Initial characterization of the calcium channel activated by the cross-linking of the receptors for immunoglobulin E. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(16), 10188–10193.
- Kanno, T., Cochrane, D. E., & Douglas, W. W. (1973). Exocytosis (secretory granule extrusion) induced by injection of calcium into mast cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 51(12), 1001–1004. <https://doi.org/10.1139/y73-153>
- Kaposi, A. S., Veress, G., Vászrhelyi, B., Macardle, P., Bailey, S., Tulassay, T., & Treszl, A. (2008). Cytometry-acquired calcium-flux data analysis in activated lymphocytes. *Cytometry Part A*, 73A(3), 246–253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cyto.a.20518>
- Kashio, M., & Tominaga, M. (2017). Redox-Sensitive TRP Channels: TRPA1 and TRPM2. *Redox - Principles and Advanced Applications*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69202>

- Kawakami, T., & Kitaura, J. (2005). Mast cell survival and activation by IgE in the absence of antigen: a consideration of the biologic mechanisms and relevance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(7), 4167–4173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4167>
- Keegan, A. D., & Paul, W. E. (1992). Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways. *Immunology Today*, 13(2), 63–68. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90136-U](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90136-U)
- Kistner, K., Siklosi, N., Babes, A., Khalil, M., Selescu, T., Zimmermann, K., Wirtz, S., Becker, C., Neurath, M. F., Reeh, P. W., & Engel, M. A. (2016). Systemic desensitization through TRPA1 channels by capsazepine and mustard oil - a novel strategy against inflammation and pain. *Scientific Reports*, 6(1), 28621. <https://doi.org/10.1038/srep28621>
- Kraft, S., & Kinet, J. P. (2007). New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 365–378. <https://doi.org/10.1038/nri2072>
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., & Wood, J. G. (2016). Mast cell: A multi-functional master cell. *Frontiers in Immunology*, 6(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>
- Kula, R., Bébarová, M., Matejovič, P., Šimurda, J., & Pásek, M. (2020). Current density as routine parameter for description of ionic membrane current: is it always the best option? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 157, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.11.011>
- Kumar, R., Hazan, A., Basu, A., Zalcman, N., Matzner, H., & Priel, A. (2016). Tyrosine Residue in the TRPV1 Vanilloid Binding Pocket Regulates Deactivation Kinetics. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(26), 13855–13863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726372>
- Kuno, M., Shibata, T., Kawawaki, J., & Kyogoku, I. (1995). A Heterogeneous Electrophysiological Profile of Bone Marrow-derived Mast Cells. *The Journal of Membrane Biology*, 143, 115–122. <https://doi.org/10.1126/science.198.4316.499-a>
- Kwon, D. H., Zhang, F., Suo, Y., Bouvette, J., Borgnia, M. J., & Lee, S.-Y. (2021). Heat-dependent opening of TRPV1 in the presence of capsaicin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(7), 554–563. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00616-3>
- Lam, R. S., Shumilina, E., Matzner, N., Zemtsova, I. M., Sobiesiak, M., Lang, C., Felder, E., Dietl, P., Huber, S. M., & Lang, F. (2008). Phosphatidylinositol-3-kinase regulates mast cell ion channel activity. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 22(1–4), 169–176. <https://doi.org/10.1159/000149794>
- Lazzeri, M., Vannucchi, M. G., Zardo, C., Spinelli, M., Beneforti, P., Turini, D., & Fausone-Pellegrini, M.-S. (2004). Immunohistochemical Evidence of Vanilloid Receptor 1 in Normal Human Urinary Bladder. *European Urology*, 46(6), 792–798. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eururo.2004.08.007>
- Lee, J. H., Lee, Y. S., Lee, E. J., & Kim, T. Y. (2015). Capsiate Inhibits DNFB-Induced Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice through Mast Cell and CD4+ T-Cell Inactivation. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(8), 1977–1985. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.117>
- Leech, C. A., & Holz, G. G. (1994). Application of patch clamp methods to the

- study of calcium currents and calcium channels. *Methods in Cell Biology*, 40, 135–151. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61113-9](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61113-9)
- Li, Z., Liu, S., Xu, J., Zhang, X., Han, D., Liu, J., Xia, M., Yi, L., Shen, Q., Xu, S., Lu, L., & Cao, X. (2018). Adult Connective Tissue-Resident Mast Cells Originate from Late Erythro-Myeloid Progenitors. *Immunity*, 49(4), 640-653.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.023>
- Liao, H., Peng, X., Ge, Y., Liang, Y., Yin, Y., Li, J., Lin, L., Wang, J., Li, Y., & Li, L. (2020). Novel reactivation and degranulation of mast cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 127(December 2019). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110157>
- Lindau, M., & Fernandez, J. M. (1986). A Patch-Clamp Study of Histamine-secreting Cells. 88(September).
- Lindau, M., & Neher, E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 411(2), 137–146. <https://doi.org/10.1007/BF00582306>
- Liu, L., & Simon, S. A. (1997). Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience Letters*, 228(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00358-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00358-3)
- Lv, Z., Xu, X., Sun, Z., Yang, Y. X., Guo, H., Li, J., Sun, K., Wu, R., Xu, J., Jiang, Q., Ikegawa, S., & Shi, D. (2021). TRPV1 alleviates osteoarthritis by inhibiting M1 macrophage polarization via Ca²⁺/CaMKII/Nrf2 signaling pathway. *Cell Death and Disease*, 12(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03792-8>
- Ma, H. T., & Beaven, M. A. (2009). Regulation of Ca² signaling with particular focus on mast cells. *Critical Reviews in Immunology*, 29(2), 155–186. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v29.i2.40>
- Mamatova, K. N., & Kang, T. M. (2013). Activation of rat transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Integrative Medicine Research*, 2(3), 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2013.06.002>
- Marshall, J. S. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 4(10), 787–799. <https://doi.org/10.1038/nri1460>
- Meurer, S. K., Neß, M., Weiskirchen, S., Kim, P., Tag, C. G., Kauffmann, M., Huber, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158104>
- Molleman, A. (2003). Introductory guide to patch clamp electrophysiology. In *University of Hertfordshire, UK* (Vol. 53, Issue 9). John Wiley & Sons, Ltd.
- Molnar, P., & Hickman, J. J. (2007). *Patch-Clamp. Methods and Protocols* (Humana Press, (J. m. Walker (ed.)). Humana Press.
- Moon, T. C., Dean Befus, A., & Kulka, M. (2014). Mast cell mediators: Their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in Immunology*, 5(NOV), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00569>
- Mukai, K., Tsai, M., Saito, H., & Galli, S. J. (2018). Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunological Reviews*, 282(1), 121–150. <https://doi.org/10.1111/imr.12634>
- Neher, E., & Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance

- observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(21), 6712–6716. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.21.6712>
- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*, 12(3), 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>
- Nishizumi, H., & Yamamoto, T. (1997). Impaired tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ mobilization, but not degranulation, in lyn-deficient bone marrow-derived mast cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(5), 2350–2355.
- Parravicini, V., Gadina, M., Kovarova, M., Odom, S., Gonzalez-Espinosa, C., Furumoto, Y., Saitoh, S., Samelson, L. E., O'shea, J. J., & Rivera, J. (2002). Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nature Immunology*, 3(8), 741–748. <https://doi.org/10.1038/ni817>
- Puri, N., & Roche, P. A. (2008). Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2580–2585. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707854105>
- Putney, J. W., Broad, L. M., Braun, F. J., Lievremont, J. P., & Bird, G. S. J. (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *Journal of Cell Science*, 114(12), 2223–2229.
- Qian, Y. X., & McCloskey, M. A. (1993). Activation of mast cell K⁺ channels through multiple G protein-linked receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16), 7844–7848. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7844>
- Ramahi, A. A., & Ruff, R. L. (2014). *Membrane Potential* (M. J. Aminoff & R. B. B. T.-E. of the N. S. (Second E. Daroff (eds.); pp. 1034–1035). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00062-2>
- Romanin, C., Reinsprecht, M., Pecht, I., & Schindler, H. (1991). Immunologically activated chloride channels involved in degranulation of rat mucosal mast cells. *The EMBO Journal*, 10(12), 3603–3608. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1718738>
- Sakaguchi, R., & Mori, Y. (2020). Transient receptor potential (TRP) channels: Biosensors for redox environmental stimuli and cellular status. *Free Radical Biology and Medicine*, 146, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.415>
- Samways, D. S. K., & Egan, T. M. (2011). Calcium-dependent decrease in the single-channel conductance of TRPV1. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 462(5), 681–691. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1013-7>
- 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. *Bioche Sanchez-Miranda, Elizabeth, Alfredo Ibarra-Sanchez, and Claudia Gonzalez-Espinosa. 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.139>

- Schulman, E. S., Kagey-Sobotka, A., MacGlashan, D. W. J., Adkinson, N. F. J., Peters, S. P., Schleimer, R. P., & Lichtenstein, L. M. (1983). Heterogeneity of human mast cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 131(4), 1936–1941.
- Schwartz, L. B., & Austen, K. F. (1980). Enzymes of the mast cell granule. *Journal of Investigative Dermatology*, 74(5), 349–353. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12543620>
- Scott, M. T., Claudia, G.-E., Ramachandran, A., Sandhya, X., Victor, T., & Juan, R. (2001). Vav1 Regulates Phospholipase C γ Activation and Calcium Responses in Mast Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 21(11), 3763–3774. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.11.3763-3774.2001>
- Shunichi, S., Takahashi, N., & Mori, Y. (2014). TRPs as Chemosensors (ROS, RNS, RCS, Gasotransmitters). In B. Nilius & V. Flockerzi (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 223, Issue October, pp. 937–962). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-05161-1>
- Siebenhaar, F., Redegeld, F. A., Bischoff, S. C., Gibbs, B. F., & Maurer, M. (2017). Mast Cells as Drivers of Disease and Therapeutic Targets. *Trends in Immunology*, 39(2), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.10.005>
- Siraganian, R. P., Castro, R. O. De, Barbu, E. A., & Zhang, J. (2011). Activation and Screening methods for New Pathway Participants. *FEBS Letters*, 584(24), 4933–4940. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.006.Mast>
- Smith, P. K., & Nilius, B. (2013). Transient Receptor Potentials (TRPs) and Anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 13, 93–100. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0301-4>
- Smutzer, G., & Devassy, R. K. (2016). Integrating TRPV1 Receptor Function with Capsaicin Psychophysics. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1512457>
- Solís-López, A., Kriebs, U., Marx, A., Mannebach, S., Liedtke, W. B., Caterina, M. J., Freichel, M., & Tsvilovskyy, V. V. (2017). Analysis of TRPV channel activation by stimulation of FC ϵ RI and MRGPR receptors in mouse peritoneal mast cells. *PLoS ONE*, 12(2), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171366>
- Spassova, M. A., Soboloff, J., He, L. P., Hewavitharana, T., Xu, W., Venkatachalam, K., Van Rossum, D. B., Patterson, R. L., & Gill, D. L. (2004). Calcium entry mediated by SOCs and TRP channels: Variations and enigma. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1742(1–3), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.001>
- Ständer, S., Moormann, C., Schumacher, M., Buddenkotte, J., Artuc, M., Shpacovitch, V., Brzoska, T., Lippert, U., Henz, B. M., Luger, T. A., Metzke, D., & Steinhoff, M. (2004). Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Experimental Dermatology*, 13(3), 129–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2004.0178.x>
- Stokes, A. J., Shimoda, L. M. N., Koblan-Huberson, M., Adra, C. N., & Turner, H. (2004). A TRPV2-PKA signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells. *Journal of Experimental Medicine*, 200(2), 137–147. <https://doi.org/10.1084/jem.20032082>

- Suzuki, Y., Inoue, T., & Ra, C. (2010). L-type Ca²⁺ channels: A new player in the regulation of Ca²⁺ signaling, cell activation and cell survival in immune cells. *Molecular Immunology*, 47(4), 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.10.013>
- Suzuki, Y., Inoue, T., & Ra, C. (2012). Calcium Signaling in Mast Cells: Focusing on L-Type Calcium Channels. In J. B. Parys & H. De Smedt (Eds.), *Calcium Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 740, p. 1267). Science+Business, Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_44
- Taberner, F. J., Devesa, I., & Ferrer-Montiel, A. (2016). Calcium Entry Through Thermosensory Channels. In J. A. Rosado (Ed.), *Calcium Entry Pathways in Non-excitabile Cells* (Vol. 898, pp. 265–304). Springer. <https://doi.org/10.1002/jcb.21320>
- Talavera, K., & Nilius, B. (2016). Electrophysiological methods for the study of TRP channels. *TRP Channels*, 237–254. <https://doi.org/10.1201/b10896-16>
- Tanaka, S. (2020). Phenotypic and Functional Diversity of Mast Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3835. <https://doi.org/10.3390/ijms21113835>
- Thilo, L. (1985). Selective internalization of granule membrane after secretion in mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(6), 1711–1715. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.6.1711>
- Tshori, S., & Razin, E. (2010). Mast cell degranulation and calcium entry-the Fyn-calcium store connection. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(5), 837–838. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610365>
- Turner, H., & Kinet, J. P. (1999). Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. *Nature*, 402(6760 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1038/35037021>
- Vig, M., & Kinet, J.-P. (2009). Calcium signaling in immune cells. *Nature Immunology*, 10(1), 21–28. <https://doi.org/10.1038/ni.f.220/>
- Vriens, J., Appendino, G., & Nilius, B. (2009). Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Molecular Pharmacology*, 75(6), 1262–1279. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055624>
- Wagner, B., Miller, W. H. J., Erb, H. N., Lunn, D. P., & Antczak, D. F. (2009). Sensitization of skin mast cells with IgE antibodies to Culicoides allergens occurs frequently in clinically healthy horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(1), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.015>
- Walz, W. (2007). *Patch-Clamp Analysis* (W. Walz (ed.); Second, Vol. 3). Human Press.
- Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, June. <https://doi.org/10.1038/nri3690>
- Wischmeyer, E., Lentjes, K. U., & Karschin, A. (1995). Physiological and molecular characterization of an IRK-type inward rectifier K⁺ channel in a tumour mast cell line. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 429(6), 809–819. <https://doi.org/10.1007/BF00374805>
- Xiao, W., Nishimoto, H., Hong, H., Kitaura, J., Nunomura, S., Maeda-Yamamoto, M., Kawakami, Y., Lowell, C. A., Ra, C., & Kawakami, T. (2005). Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcεRI. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(10), 6885–6892.

- <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6885>
- Xue, L., & Mei, Y. (2011). Synaptic vesicle recycling at the calyx of Held. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(3), 280–287. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.212>
- Yang, B., Yang, C., Wang, P., Li, J., Huang, H., Ji, Q., Liu, J., & Liu, Z. (2013). Food allergen-induced mast cell degranulation is dependent on PI3K-mediated reactive oxygen species production and upregulation of store-operated calcium channel subunits. *Scandinavian Journal of Immunology*, 78(1), 35–43. <https://doi.org/10.1111/sji.12062>
- Yang, M. H., Jung, S. H., Sethi, G., & Ahn, K. S. (2019). Pleiotropic pharmacological actions of capsazepine, a synthetic analogue of capsaicin, against various cancers and inflammatory diseases. *Molecules*, 24(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules24050995>
- Yao, X., Kwan, H. Y., & Huang, Y. (2006). Regulation of TRP channels by phosphorylation. *NeuroSignals*, 14(6), 273–280. <https://doi.org/10.1159/000093042>
- YONG, L. C. J. (1997). The mast cell : origin , morphology , distribution , and function. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 49(6), 409–424. [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(97\)80129-7](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(97)80129-7)
- Zhang, D., Spielmann, A., Wang, L., Ding, G., Huang, F., Gu, Q., & Schwarz, W. (2012). Mast-cell degranulation induced by physical stimuli involves the activation of transient-receptor-potential channel TRPV2. *Physiological Research*, 61(1), 113–124. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932053>
- Zhang, Xiaoli, Hu, M., Yang, Y., & Xu, H. (2018). Organellar TRP channels. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(11), 1009–1018. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0148-z>
- Zhang, Xuming, Huang, J., & McNaughton, P. A. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO Journal*, 24(24), 4211–4223. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600893>

Firmas de Aprobación de Tesis