



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

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Participación de los canales de calcio tipo L y la proteína AHNAK
en la secreción de TNF estimulada por LPS en células cebadas**

Tesis que presenta

Josué Jonatan Pichardo Espino

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de tesis

Dra. Claudia González Espinosa

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en los laboratorios N°11 y N°9 del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav, Unidad Sede Sur, gracias a los apoyos ANR-Conacyt 188565 y FC 1122 a CGE y CB-2016-281617 a EJGE. Durante el desarrollo de esta tesis, se contó con el apoyo de la beca N° 615649 de Conacyt para JJPE.

Dedicatoria

A mis padres, Esther y José
A mis hermanos, Miriam y Diego

Agradecimientos

Quisiera expresar mi gratitud al MC Gabriel Herrera López y al MC Fernando Iván Ceballos Escobar por acompañarme y alentarme en esta empresa interdisciplinaria entre la Electrofisiología, la Inmunología y la Palabra. Así mismo, agradezco a la DC Gabriela Rodríguez Manzo y al DC José de Jesús Aceves Buendía sus comentarios, sugerencias y críticas al manuscrito.

También tengo una deuda con la MC Itzel Guadalupe Ramírez Moreno, la MC Marian Jesabel Pérez Rodríguez, el C Rodolfo Pérez Lagunes, el QFB Juan Javier López y el MC Alfredo Ibarra Sánchez, por el apoyo técnico que me brindaron durante el proyecto.

“El problema con la realidad, es que no sabe nada de teoría”

Don Durito de La Lacandona

“La ciencia es una empresa esencialmente anarquista; el anarquismo teórico es más humanista y más adecuado para estimular el progreso que sus alternativas basadas en la ley y en el orden”

Contra el método. Paul Feyerabend.

"No está nada claro que la investigación científica exija una libertad absoluta de palabra y de debate. Por el contrario, la evidencia sugiere que ciertos tipos de esclavitud no suponen ningún obstáculo en el camino de ciencia..."

The poverty of liberalism, Robert Paul Wolff.

Índice General

Índice de Figuras.....	III
Índice de Tablas.....	IV
Índice de Abreviaturas	V
Resumen	X
Abstract	XI
1. Marco Teórico.....	1
1.1 Aspectos Generales de las Células Cebadas	2
1.1.1 Ontogenia y diferenciación.....	2
1.1.2 Heterogeneidad	3
1.1.3 Papel fisiológico: el reconocimiento de patógenos.....	8
1.2 Activación de las MCs a través de Receptor Tipo Toll 4	9
1.2.1 Estructura y función de los receptores tipo Toll expresados en MCs.	10
1.2.2 Vías de transducción del receptor TLR-4.....	11
1.3 Mecanismos de Desgranulación en las MCs: Comparación entre la Desgranulación Anafiláctica y la Desgranulación Picemal	11
1.4 Universalidad vs Especificidad de la Señal de Ca ²⁺ en Células Eucariontes.....	14
1.4.1 Las proteínas de andamiaje como intermediarios en la generación de respuestas complejas: AHNAK1 como ejemplo.	14
1.5 El Ca ²⁺ en la Secreción de Mediadores en MCs	16
1.6 Mecanismos de Movilización de Ca ²⁺ en MCs.....	17
1.6.1 Entrada de Ca ²⁺ dependiente del vaciamiento de almacenes intracelulares: adiós al canon.	17
1.6.2 Entrada de Ca ²⁺ dependiente de voltaje: ¿marcadores de la excitabilidad?	18
1.6.2.1 Clasificación de los canales de Ca ²⁺ activados por voltaje.....	19
1.6.2.2 Estructura de los Ca _v	20
1.6.2.2.1 Subunidad α ₁ : poro del canal.	21
1.6.2.2.2 Subunidad β.	21
1.6.2.3 Canales de Ca ²⁺ tipo L.	23
2. Planteamiento del Problema	24
3. Hipótesis.....	25

4. Objetivos.....	25
4.1 Objetivo General	25
4.2 Objetivos Particulares.....	25
5. Materiales y Métodos	26
5.1 Animales	26
5.2 Cultivo de BMMCs	26
5.3 Cuantificación de la Secreción de TNF- α	27
5.4 Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal	27
5.5 Patch-Clamp.....	28
6. Resultados.....	30
6.1 La Nifedipina Inhibe la Secreción del TNF- α Estimulada por LPS en BMMCs.....	30
6.2 El LPS Induce una Corriente Entrante de Ca ²⁺ Mediada por LTCC en BMMCs.....	31
6.3 El LPS no Induce Colocalización entre las Proteínas AHNAK1 y la Subunidad β_2 de los LTCC en BMMCs	36
6.4 El LPS no Modifica el Patrón de Distribución de la Subunidad α_{1C} de los LTCC en BMMCs	37
7. Discusión	38
7.1 El Ca ²⁺ en la Secreción del TNF- α	38
7.2 Mecanismo de Activación de los LTCC en Células no Excitables.....	40
7.3 Canales Iónicos Activados en BMMCs en Reposo y Estimuladas	42
7.4 El Receptor TLR-4 y su Acoplamiento a la Entrada de Ca ²⁺	43
7.5 Localización Subcelular de AHNAK1 y de las Proteínas Accesorias de los LTCC..	45
7.6 Distribución Subcelular de la Subunidad α_1 de los LTCC y su Mecanismo de Activación.....	47
8. Conclusiones.....	49
9. Perspectivas	49
10. Bibliografía.....	50

Índice de Figuras

Figura 1. Desarrollo y diferenciación de las MCs de ratón.....	3
Figura 2. Sistema de señalización del receptor Toll tipo 4.	12
Figura 3. Estructura de AHNAK1.	15
Figura 4. Homología de la subunidad α_1 de los Cav.	20
Figura 5. Estructura de los Cav.....	22
Figura 6. Efecto de la nifedipina sobre la secreción del TNF- α estimulada por LPS en BMMCs.	30
Figura 7. Propiedades pasivas de las BMMCs.	31
Figura 8. Inducción de una corriente entrante por la estimulación con LPS en BMMCs....	32
Figura 9. Selectividad iónica de la corriente entrante inducida por LPS en BMMCs.	33
Figura 10. Inducción de una corriente tipo L por la estimulación con LPS en BMMCs....	34
Figura 11. Localización celular de las proteínas AHNAK1 y de la subunidad β_2 en BMMCs.	35
Figura 12. Localización celular de la subunidad α_{1C} en BMMCs.	36

Índice de Tablas

Tabla 1 Características y funciones de los constituyentes granulares de las MCs	4
Tabla 2 Características de las células cebadas murinas	6
Tabla 3 Características de las células cebadas humanas	7

Índice de Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ABP	Bolsillo de unión al dominio de asociación alfa
Ag	Antígeno
AID	Dominio de asociación alfa
AND	Desgranulación anafiláctica
AP-1	Proteína 1 activadora
2-APB	2-aminoetoxifenil borato
BaPs	Progenitores de basófilos
BAPTA-AM	Ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano- <i>N, N, N', N'</i> -tetraacético tetrakis (acetoximetil éster)
BMCP	Progenitor bipotencial de basófilos-células cebadas
BMMCs	Células cebadas derivadas de la médula ósea
BSA	Albúmina sérica bovina
[Ca ²⁺] _i	Concentración intracelular de Ca ²⁺
CAD	Dominio de activación CRAC
CaM	Calmodulina
CaMKII	Proteína cinasa tipo II dependiente de Ca ²⁺ / calmodulina
Ca _v	Canales de calcio activados por voltaje
CD	Grupo de diferenciación
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺
CICUAL	Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio
CLP	Progenitor linfoide común
C _m	Capacitancia membranal
CMA1	Quimasa
CMP	Progenitor mieloide común
CPA3	Carboxipeptidasa A3
cPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ citosólica
CRAC	Canales de Ca ²⁺ activados por la liberación de Ca ²⁺

CTMCs	Células cebadas de tejido conectivo
CTRs	Receptores de lectina tipo C
DABCO	1,4-diazabicyclo
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DHP	Dihidropiridinas
DHPR	Receptores a dihidropiridinas
DYSF	Disferlina
EGTA	Ácido de etilen glicol-bis(2-aminoetileter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Retículo endoplásmico
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FBS	Suero fetal bovino
FcεRI	Receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina tipo E
GK	Dominio guanilato cinasa
GMP	Progenitor de granulocitos-macrófagos
HMCs	Células cebadas humanas
HSCs	Células troncales hematopoyéticas
HSP60	Proteína 60 de choque térmico
HVA	Canales de Ca ²⁺ activados por una despolarización elevada
<i>I_{Ca2+}, LPS</i>	Corriente de Ca ²⁺ inducida por la estimulación con lipopolisacárido
<i>I_{CRAC}</i>	Corriente mediada por canales de Ca ²⁺ activados por la liberación de Ca ²⁺
IFN	Interferón
IgE	Inmunoglobulina tipo E
IgG	Inmunoglobulina tipo G
<i>I_{Kir}</i>	Corriente de K ⁺ de rectificación entrante
IL	Interleucina
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
IRF	Factor regulador de interferón
IUPHAR	Unión Internacional de Farmacología
K _{Ca}	Canales de K ⁺ activados por Ca ²⁺
K _v	Canales de K ⁺ activados por voltaje

LBP	Proteína de unión al lipopolisacárido
5-LOX	5-lipoxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTCC	Canales de Ca ²⁺ tipo L
LVA	Canales de Ca ²⁺ activados por una despolarización baja
MCPs	Precusores de células cebadas
MCs	Células cebadas
MC _T	Células cebadas humanas triptasa positivas
MC _{TC}	Células cebadas humanas triptasa-quimasa positivas
MD2	Factor 2 de diferenciación mieloide
MEP	Progenitor de megacariocitos-eritrocitos
mMCP	Proteasa de células cebadas murinas
MMCs	Células cebadas mucosales
MPPs	Progenitores multipotenciales
MyD88	Factor 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
Na _v	Canales de Na ⁺ activados por voltaje
NFAT	Factor nuclear de linfocitos T activados
NFκB	Factor nuclear kappa B
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NLRs	Receptores tipo dominio de oligomerización por unión de nucleótidos
NMDG	N-metil-D-glucamina
ORAI1	Modulador 1 de Ca ²⁺ activado por la liberación de Ca ²⁺
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PD	Dominio de poro
PDZ	PSD95/Discs-large/ZO1
PFA	Paraformaldehído
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PKA	Proteína cinasa A

PKB	Proteína cinasa B
PKC	Proteína cinasa C
PLC γ	Fosfolipasa C gamma
PMA	Forbol-miristato-acetato
PMD	Desgranulación picemal
PP2A	Fosfatasa 2A
pre-BMP	Progenitor bipotencial de médula ósea
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RBL	Leucemia basofílica de rata
RLRs	Receptores tipo gen I inducible por ácido retinoico
rpm	Revoluciones por minuto
R-Smads	Proteínas Smad reguladoras
RSV	Virus respiratorio sincicial
RyR	Receptores de rianodina
SEM	Error estándar de la media
SERCA	ATPasa-Ca ²⁺ del retículo endoplásmico
SH3	Dominio de homología a Src 3
SNAREs	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors</i>
SOAR	Región de activación STIM1-Orai
SOCE	Entrada de Ca ²⁺ dependiente del vaciamiento de almacenes intracelulares
STIM1	Molécula 1 de interacción estromal
TCR	Receptor de linfocitos T
TEA-Cl	Cloruro de tetraetilamonio
Tg	Tapsigargina
TGF- β	Factor beta de crecimiento transformante
TIR	Receptor de interleucina 1
TIRAP	Proteína adaptadora que contiene el dominio del receptor Toll/IL-1
TLRs	Receptores tipo Toll
TMD	Dominio transmembranal
TNF- α	Factor alfa de necrosis tumoral
TRAM	Moléculas adaptadora relacionada con TRIF

TRIF	Adaptador que contiene el dominio TIR inductor de interferón beta
TRPM7	Receptor de potencial transitorio de melastatina 7
TRPs	Receptores de potencial transitorio
t-SNARE	SNARE blanco
VEGF	Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular
VOCE	Entrada de Ca ²⁺ dependiente de voltaje
VSD	Dominio sensor de voltaje
v-SNARE	SNARE vesicular
τ	Constante de tiempo

Resumen

El calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero universal que regula una gran variedad de procesos celulares. En células no excitables, los canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+} (CRAC) se consideran la vía principal para la entrada de Ca^{2+} , no obstante, un grupo creciente de evidencias sugiere la presencia funcional de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) en células no excitables. Las células cebadas (MCs) son células secretoras del sistema inmune, en las que se ha propuesto que el Ca^{2+} es un elemento necesario para su activación. En este tipo celular, previamente se reportó que la secreción del factor alfa de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) inducida por la estimulación con lipopolisacárido (LPS) requiere de la movilización de Ca^{2+} , sin embargo, los elementos implicados en su regulación están poco explorados. En este trabajo, utilizamos células cebadas derivadas de médulas ósea (BMMCs) para evaluar la participación de los canales de Ca^{2+} tipo L (LTCC) y de la proteína de andamiaje AHNAK1 en la secreción del $\text{TNF-}\alpha$ inducida por la estimulación con lipopolisacárido (LPS). Nuestros resultados muestran que el pretratamiento con nifedipina, antagonista selectivo de los LTCC, inhibió la secreción del $\text{TNF-}\alpha$ inducida por la estimulación con LPS en BMMCs. Adicionalmente, caracterizamos electrofisiológicamente la corriente mediada por los LTCC en BMMCs. Encontramos que la estimulación con LPS indujo la modulación de una corriente entrante de Ca^{2+} sensible a nifedipina. Al explorar el mecanismo responsable de la modulación de la corriente tipo L, observamos que la estimulación con LPS no parece estar relacionada con la asociación entre la proteína de andamiaje AHNAK1 y la subunidad β_2 de los LTCC, ni a la redistribución de la subunidad α_{1C} de los LTCC hacia la membrana plasmática de las BMMCs. En suma, nuestros datos sugieren que la activación del TLR-4 induce la aparición de una corriente mediada por LTCC que contribuye a la entrada de Ca^{2+} extracelular necesaria para la secreción del $\text{TNF-}\alpha$ estimulada por LPS en BMMCs.

Abstract

Calcium (Ca^{2+}) is a ubiquitous second messenger that regulates a wide range of cellular processes. In non-excitabile cells, Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channels (CRAC) are considered the major route of Ca^{2+} entry, however, a growing body of evidence suggests the existence of functional voltage-gated Ca^{2+} channels (Ca_v) in a variety of non-excitabile cells. Mast cells (MCs) are immune system secretory cells, in which it has been proposed that Ca^{2+} is a necessary element for their activation. It was previously reported that lipopolysaccharide (LPS) induced tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) release in mast cells was dependent on Ca^{2+} mobilization, but the elements involved in its regulation are not fully described. Here, we used bone marrow-derived mast cells (BMMCs) to investigate the role of L-type Ca^{2+} channels (LTCC) and the scaffolding protein AHNAK1 in the LPS-induced $\text{TNF-}\alpha$ secretion. Our results show that pretreatment with nifedipine, a selective antagonist of LTCC, inhibited the LPS-induced $\text{TNF-}\alpha$ release in BMMCs. In addition, we electrophysiologically characterize the current mediated by LTCC in BMMCs. We found that stimulation with LPS induced the modulation of a nifedipine-sensitive inward Ca^{2+} current. When exploring the mechanism responsible for the modulation of L-type current, we observed that stimulation with LPS does not seem to be related to the association between AHNAK1 and the β_2 subunit of LTCC, nor the targeting of the α_{1C} subunit of LTCC to the plasma membrane of BMMCs. In summary, our data suggest that the activation of Toll-like receptor 4 (TLR-4) induces the modulation of a current mediated by LTCC that contributes to the extracellular Ca^{2+} entry necessary for the LPS-induced $\text{TNF-}\alpha$ secretion in BMMCs.

1. Marco Teórico

Resulta difícil imaginar un proceso celular que no esté influenciado directa o indirectamente por el calcio (Ca^{2+}). Históricamente, uno de los primeros fenómenos celulares en los que se estableció el papel de la movilización del Ca^{2+} como un evento desencadenante fue la secreción del contenido vesicular, una característica que comparten las células excitables y no excitables. Dicho paradigma emergió a partir de los estudios sobre liberación cuántica de los neurotransmisores en la unión neuromuscular (Katz, 1962; Katz, 1996). Posteriormente, se extendería a diversos tipos celulares, con lo cual el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se establecería como un evento clave en el acoplamiento estímulo-secreción (Douglas, 1968), tanto en células excitables como no excitables.

No obstante, evidencias posteriores modificarían la visión simplista del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como mecanismo universal para el control de la secreción. Por ejemplo, se demostraría que en células cebadas (MCs, por sus siglas en inglés) se puede inducir la secreción aún en ausencia de un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Neher, 1988). Es decir, mientras en células excitables el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ *per se* es suficiente para desencadenar la secreción, en células no excitables, el evento parece tener un efecto modulador.

A pesar de que los mecanismos dependientes de Ca^{2+} asociados a la secreción celular siguen en investigación, sus implicaciones en diversos procesos de señalización se han propagado en popularidad e importancia a un ritmo exponencial, con lo cual, su revaloración resulta algo más que vigente tanto en la participación de las vías de señalización (Feske, Wulff, & Skolnik, 2015; Stokes, MacKenzie, & Sluyter, 2016), como en la descripción de las características espaciotemporales propias del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – entre las que destacan las oscilaciones y las ondas de Ca^{2+} (Cohen, Torres, Ma, Holowka, & Baird, 2009).

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la participación de algunos elementos que regulan la señalización del Ca^{2+} para el control de la secreción en MCs, particularmente de aquellos que, *por definición*, se han considerado como marcadores moleculares de la excitabilidad. Este trabajo trató, además, de la característica espaciotemporal de la respuesta mediada por Ca^{2+} .

Para una mejor comprensión del estudio, en esta parte introductoria daremos una breve descripción de las características y funciones de nuestro modelo celular (las MCs), de su activación a través de un receptor de la inmunidad innata y de los mecanismos de movilización de Ca^{2+} descritos.

1.1 Aspectos Generales de las Células Cebadas

1.1.1 Ontogenia y diferenciación.

Las MCs son células no excitables, provenientes del tronco mieloide del sistema inmune. En el embrión se producen en el saco vitelino (Gentek *et al.*, 2018), mientras que en el adulto se generan a partir de precursores hematopoyéticos, localizados en la médula ósea (Kitamura, Shimada, Hatanaka, & Miyano, 1977), en un proceso regulado por diversos factores de transcripción. Las MCs, a diferencia de la mayoría de las células hematopoyéticas, salen de su nicho generador a la circulación sanguínea como células inmaduras, denominadas precursores de células cebadas (MCPs) (Sonoda, Ohno, & Kitamura, 1982). Estos precursores requieren migrar a los tejidos periféricos para finalizar su proceso de maduración (Hatanaka, Kitamura, & Nishimune, 1979).

A pesar de que no se conoce del todo el proceso de diferenciación de las MCs, se tiene evidencia experimental de dos vías principales. En la primera, las células troncales hematopoyéticas (HSCs) dan lugar al desarrollo de progenitores multipotenciales (MPPs), los cuales se diferencian en el progenitor mieloide común (CMP)¹ (Figura 1) (Akashi, Traver, Miyamoto, & Weissman, 2000). El CMP puede diferenciarse en progenitor de megacariocitos-eritrocitos (MEP) o en progenitor de granulocitos-macrófagos (GMP) (Figura 1) (Akashi *et al.*, 2000). En específico, el GMP da lugar al desarrollo de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y a dos tipos de progenitores bipotenciales, capaces de diferenciarse en los MCPs o en los progenitores de basófilos (BaPs) (Akashi *et al.*, 2000; Arinobu *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2013). El primer progenitor bipotencial de basófilos-células cebadas (BMCP) se localiza en el bazo (Figura 1) (Arinobu *et al.*, 2005), mientras que el segundo tipo reside en la médula ósea (pre-BMP) (Qi *et al.*, 2013).

Además de esa vía, se ha propuesto la existencia de un modelo alternativo para el desarrollo de los MCPs. Esta vía alternativa propone que los MCPs pueden derivarse

¹ Los MPPs en principio también pueden diferenciarse en el progenitor linfoide común (CLP).

directamente de los MPPs o de los CMPs (Figura 1) (Chen, Grimbaldston, Tsai, Weissman, & Galli, 2005; Franco, Chen, Drukker, Weissman, & Galli, 2010).

A pesar de las diferencias planteadas entre los modelos, ambos coinciden en que, en el adulto, los MCPs son liberados a la circulación sanguínea donde migran a los tejidos periféricos para finalizar su proceso de maduración.

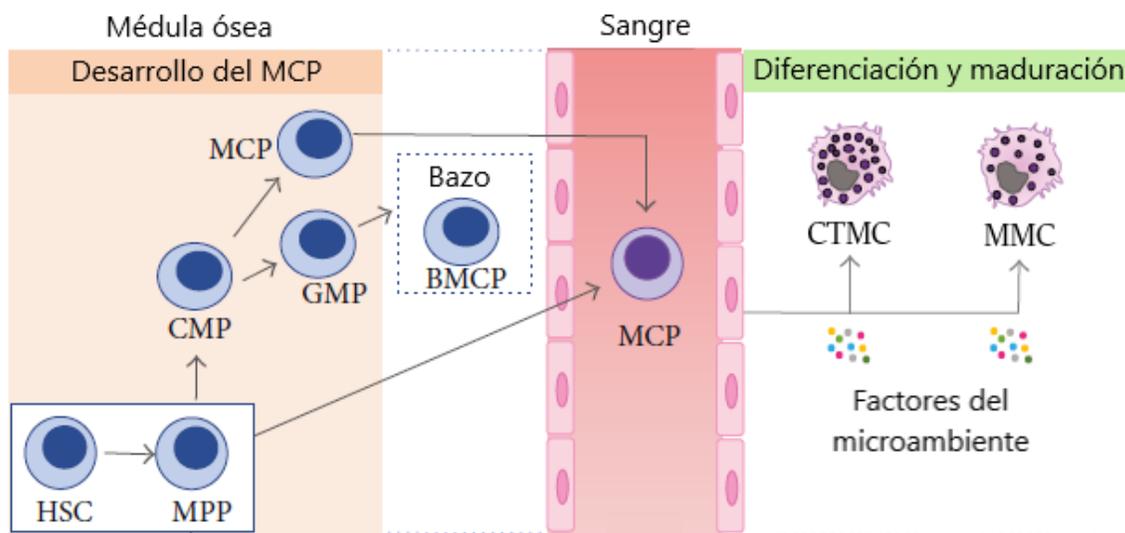


Figura 1. Desarrollo y diferenciación de las MCs de ratón. Las MCs se generan a partir de las HSC, a través de los MPP. Los MCP pueden derivarse directamente de los MPP o, a través de un CMP. El GMP da lugar al desarrollo de dos tipos de progenitores bipotenciales: el BMCP, situado en el bazo y, el pre-BMP localizado en la médula ósea. Los MCP finalizan su proceso de diferenciación en los tejidos periféricos, adquiriendo características fenotípicas que dependen del microambiente tisular. Se reconocen dos subtipos de MCs en ratón: las CTMC y las MMC. BMCP, progenitor bipotencial de basófilos-células cebadas; CMP, progenitor mielóide común; CTMC, células cebadas de tejido conectivo; GMP, progenitor de granulocitos-macrófagos; HSC, células troncales hematopoyéticas; MC, células cebadas; MCP, precursores de células cebadas; MMC, células cebadas mucosales; MPP, progenitores multipotenciales; pre-BMP, progenitor bipotencial de médula ósea. Adaptada de “Mast cell, the neglected member of the tumor microenvironment: Role in breast cancer,” por A. Aponte-López, E. M. Fuentes-Pananá, D. Cortes-Muñoz, y S. Muñoz-Cruz, 2018, *Journal of Immunology Research*, 2018, p. 3.

1.1.2 Heterogeneidad

La característica morfológica más relevante de las MCs es su elevado número de gránulos electrodensos citoplasmáticos, los cuales contienen una amplia variedad de compuestos preformados (véase Tabla 1) (Wernersson & Pejler, 2014). Entre ellos, la histamina es

probablemente el compuesto más conocido. Sin embargo, las MCs no constituyen una población celular homogénea, sino que adquieren características fenotípicas particulares – incluidos los compuestos granulares – como respuesta al microambiente tisular donde residen (Kobayashi *et al.*, 1986; Otsu *et al.*, 1987), generando por lo tanto, subpoblaciones o subfenotipos.

Tabla 1

Características y funciones de los constituyentes granulares de las MCs

Constituyente granular	Características	Función propuesta o potencial
Enzimas lisosomales		
β -hexosaminidasa	Enzima involucrada en el recambio de carbohidratos. Empleada de manera rutinaria como un marcador de la desgranulación anafiláctica.	Papel probable en los procesos lisosomales de degradación (Schwartz, Austen, & Wasserman, 1979; Schwartz & Frank Austen, 1980; Schwartz, Lewis, Seldin, & Austen, 1981).
β -glucuronidasa, <i>N</i> -acetil- β -glucosaminidasa y β -D-galactosidasa	Enzimas involucradas en el recambio de carbohidratos.	Papel probable en los procesos lisosomales de degradación (Schwartz <i>et al.</i> , 1979, 1981; Schwartz & Frank Austen, 1980).
Proteoglicanos		
Serglicina	Expresión elevada en las MCs. También expresado por otras células hematopoyéticas y endoteliales.	Promover el almacenamiento de proteasas y aminas. Explica la tinción metacromática de las MCs (Abrink, Grujic, & Pejler, 2004).
Citocinas y factores de crecimiento		
TNF- α , factor alfa de necrosis tumoral	Citocina almacenada en gránulos pre-formados y sintetizada <i>de novo</i> en respuesta a estímulos de la inmunidad innata y adaptativa en las MCs.	Actividad proinflamatoria y reguladora del ciclo celular (Gordon & Galli, 1990).
IL-4, interleucina-4	Liberada por el entrecruzamiento de la inmunoglobulina tipo E (IgE).	Papel potencial en la polarización de los linfocitos T _{H2} mediada por las MCs (Bradding <i>et al.</i> , 1992).
VEGF, factor de crecimiento derivado del endotelio vascular	Liberado por el entrecruzamiento de la IgE.	Implicado en los efectos proangiogénicos de las MCs (Grützkau <i>et al.</i> , 1998; Lindstedt <i>et al.</i> , 2001).

Constituyente granular	Características	Función propuesta o potencial
TGF- β , factor beta de crecimiento transformante	Liberado durante la desgranulación.	Implicado en los efectos profibróticos y antiinflamatorios de las MCs (Boesiger <i>et al.</i> , 1998).
NGF, factor de crecimiento nervioso	Liberado por el entrecruzamiento de la IgE.	Implicado en interacciones potenciales entre las MCs y las terminaciones nerviosas periféricas (Leon <i>et al.</i> , 1994).
Proteasas específicas de las células cebadas		
Triptasas	Proteasas de serina. Altamente expresadas en MCs. Expresión baja en basófilos.	Funciones protectoras o perjudiciales en entornos inflamatorios (Glenner & Cohen, 1960).
Quimasas	Proteasas de serina. Altamente expresadas en MCs.	Funciones protectoras o perjudiciales en entornos inflamatorios (Benditt & Arase, 1959).
CPA3, carboxipeptidasa A3	Metaloproteinasas. Altamente expresada en MCs. Expresión baja en basófilos.	Esencial para la protección contra ciertas toxinas (Haas, Heinrich, & Sasse, 1979).
Aminas biogénicas		
Histamina	Presente en todos los subtipos de MCs de todas las especies.	Induce broncoconstricción, vasodilatación y permeabilidad vascular. Papel potencial en la señalización mediada por las MCs en las terminales nerviosas (Riley, 1953; Sjoerdsma, Waalkes, & Weissbach, 1957).
Serotonina	Niveles elevados en MCs de roedor. Niveles bajos en MCs humanas.	Neurotransmisor. Papel potencial en la señalización mediada por las MCs en las terminales nerviosas (Rowley, Benditt, Arase, & Roeper, 1956; Sjoerdsma <i>et al.</i> , 1957; Kushnir-Sukhov, Brown, Wu, Kirshenbaum, & Metcalfe, 2007).
Dopamina	Niveles bajos. No se ha reportado en MCs humanas.	Neurotransmisor. Papel potencial en la señalización mediada por las MCs en las terminales nerviosas (Freeman <i>et al.</i> , 2001).

Nota. Adaptada de “Mast cell secretory granules: armed for battle,” por S. Wernersson y G. Pejler, 2014, *Nature Reviews Immunology*, 14, p. 3-4.

Tabla 2**Características de las células cebadas murinas**

Características	Célula cebada de tejido conectivo	Célula cebada mucosal
Nombres alternativos	Célula cebada típica Célula cebada de la cavidad peritoneal	Célula cebada atípica Célula cebada de la mucosa intestinal
Criterios histoquímicos		
Fijación a formaldehído	Resistente	Sensible
Tinción con azul alcian/safranina	Safranina	Azul alcian
Fluorescencia inducida por sulfato de berberina	+	—
Criterios bioquímicos		
Proteasas		
Quimasas	mMCP4, mMCP5	mMCP1, mMCP2
Triptasas	mMCP7, mMCP7	—
Carboxipeptidasas	CPA3	—
Proteoglicanos	Heparina	Sulfato E de condroitina
Aminas biogénicas		
Histamina	1-7 µg/ 10 ⁶ células	0.4-0.6 µg/ 10 ⁶ células
5 - Hidroxitriptamina	+	+
Metabolitos del ácido araquidónico	LTC ₄ y PGD ₂	LTC ₄ » PGD ₂
Criterios funcionales		
Activada por:		
IgE-FcεRI	+	+
Compuesto 48/ 80	+	—
Criterios de crecimiento		
Proliferación dependiente de linfocitos T	—	+

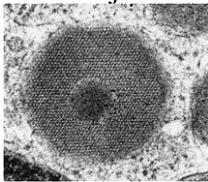
Nota. CPA3, carboxipeptidasa 3; LTC₄, leucotrieno C₄; mMCP, proteasa de células cebadas murinas; PGD₂, prostaglandina D₂. Adaptada de “Heterogeneity of mammalian mast cells differentiated in vivo and in vitro,” por H. R. Katz, R. L. Stevens, y K. F. Austen, 1985, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 76, p. 251-252; “An update on mast cell heterogeneity,” por J. Bienenstock, 1988, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 81, p. 763-765; “Mast cells,” por D. D. Metcalfe, D. Baram, y Y. A. Mekori, 1997, *Physiological Reviews*, 77, p. 1035; “Mast cell secretory granules: armed for battle,” por S. Wernersson, y G. Pejler, 2014, *Nature Reviews Immunology*, 14, p. 5.

Tradicionalmente, las MCs de roedores se clasifican con base en criterios histoquímicos, bioquímicos, funcionales, de crecimiento y localización, en dos subtipos: MCs de tejido conectivo (CTMCs) y MCs mucosales (MMCs) (Figura 1, Tabla 2) (Bienenstock, 1988). Particularmente, las CTMCs contienen heparina y una cantidad considerable de histamina, mientras que las MMCs contienen una pequeña cantidad de histamina, pero no heparina.

Aunque es posible discernir heterogeneidad entre las MCs humanas (HMCs), los criterios utilizados en el modelo bifenotípico descrito, no son aplicables a las células humanas (Enerbäck, 1987; Welle, 1997). La clasificación de las HMCs se fundamenta, principalmente, en el tipo de proteasas neutras contenidas en sus gránulos: HMCs triptasa positivas (MC_T) y HMCs triptasa-quimasa positivas (MC_{TC}) (Tabla 3) (Irani, Schechter, Craig, DeBlois, & Schwartz, 1986).

Tabla 3

Características de las células cebadas humanas

Características	Célula cebada triptasa positiva	Célula cebada triptasa-quimasa positiva
Proteasas		
Quimasas	—	CMA1
Triptasas	α/β I, β II/ β III	α/β I, β II/ β III
Carboxipeptidasas	—	CPA3
Ultraestructura granular	Rollos	Enrejado
		
Proliferación dependiente de linfocitos T	+	—
Inhibida por cromoglicato de sodio	+	—

Nota. CMA1, quimasa 1; CPA3, carboxipeptidasa 3. Adaptada de “Mast cells,” por D. D. Metcalfe, D. Baram, y Y. A. Mekori, 1997, *Physiological Reviews*, 77, p. 1035; “Ultrastructural studies of human basophils and mast cells,” por A. M. Dvorak, 2005, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53, p. 1045; “Mast cell secretory granules: armed for battle,” por S. Wernersson, y G. Pejler, 2014, *Nature Reviews Immunology*, 14, p. 5.

Si bien ambos modelos describen la diversidad fenotípica de las MCs, no todas ellas parecen adecuarse a las categorías descritas (Aldenberg & Enerbäck, 1988). Recientemente se han demostrado diferencias en marcadores de superficie, enzimas y componentes granulares, distintos a las proteasas clásicas, en MCs de pulmón (Andersson, Mori, Bjermer, Löfdahl, & Erjefält, 2009), lo que pone de manifiesto que la heterogeneidad de las MCs trasciende su clasificación canónica. Por lo anterior, se ha sugerido la creación de un sistema de clasificación que se base en el contenido granular y en los patrones de expresión de citocinas y receptores, asociados a la función que realizan las MCs en el tejido donde residen (Frossi, Mion, Sibilano, Danelli, & Pucillo, 2018).

1.1.3 Papel fisiológico: el reconocimiento de patógenos.

Las MCs son reconocidas ampliamente como agentes causantes de las enfermedades alérgicas, y este enfoque ha enfatizado su papel patológico en el organismo (Galli & Tsai, 2012). No obstante, en un contexto fisiológico, las MCs tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis tisular (Maurer *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2010) y en la cicatrización de heridas (Noli & Miolo, 2001; Wulff & Wilgus, 2013). Así, por ejemplo, dada su íntima asociación con las superficies epiteliales y los vasos sanguíneos y linfáticos, los mediadores que liberan las MCs (Tabla 1) regulan el flujo, la permeabilidad y la secreción tisular (Maurer *et al.*, 2003). Además, se ha descrito que las MCs modulan la activación, el reclutamiento y la proliferación de los linfocitos T y B (Cardamone, Parente, Feo, & Triggiani, 2016; Mekori, Hershko, Frossi, Mion, & Pucillo, 2016). Sin embargo, en las dos últimas décadas se ha generado una creciente apreciación por su función en el reconocimiento de patógenos. Debido a su localización estratégica se ha hipotetizado que actúan como *centinelas*, censando a los agentes infecciosos e iniciando una respuesta inmune (Abraham & St. John, 2010).

Los patógenos activan a las MCs a través de dos mecanismos: 1) la interacción directa entre componentes del agente extraño con los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)² y; 2) la activación indirecta, la cual incluye la unión de los patógenos o sus componentes opsonizados a receptores de inmunoglobulinas y proteínas del complemento (Rao & Brown, 2008; Johnzon, Rönnberg, & Pejler, 2016).

² Véase sección 1.2 Activación de las células cebadas a través del receptor tipo Toll 4.

Después de haber censado a los patógenos, las MCs ejercen sus efectos protectores a través de múltiples mecanismos antimicrobianos, clasificados en: 1) directos, que se llevan a cabo principalmente por medio de la lisis celular e; 2) indirectos, que involucran el reclutamiento o la modulación de las funciones de otras células inmunes (Johnzon *et al.*, 2016). Se ha sugerido que la activación de las MCs por los patógenos, o alguno de sus componentes, promueve el reclutamiento de células inmunes efectoras que controlan directamente la infección. Por ejemplo, en dos modelos murinos de peritonitis bacteriana se ha demostrado que las MCs promueven el reclutamiento de neutrófilos hacia el peritoneo, como respuesta al contacto con un componente bacteriano (Echtenacher, Männel, & Hültner, 1996; Malaviya, Ikeda, Ross, & Abraham, 1996). Dicho proceso está mediado por el TNF- α secretado por las MCs, promoviendo con ello la eliminación de las enterobacterias y la sobrevivencia del organismo.

Además de promover el reclutamiento de neutrófilos, se ha descrito que las MCs son capaces de reclutar linfocitos T CD8⁺ (grupo de diferenciación 8) al sitio de la infección, a través de un mecanismo que involucra al receptor tipo Toll 2 (véase adelante) (Carlos *et al.*, 2009).

1.2 Activación de las MCs a través de Receptor Tipo Toll 4

Para detectar rápidamente al agente infeccioso³, las MCs expresan una amplia variedad de PRRs (Agier, Pastwińska, & Brzezińska-Błaszczyk, 2018), capaces de censar estructuras altamente conservadas o *patrones moleculares* asociados a patógenos (PAMPs) (Janeway, 1989). Este grupo de receptores, codificados por genes de línea germinal, tiene una diversidad limitada y una función independiente de la memoria inmunológica en su sentido clásico. Hasta ahora, se han identificado cuatro familias de PRRs en MCs (Agier *et al.*, 2018; Redegeld, Yu, Kumari, Charles, & Blank, 2018). Dichas familias incluyen a proteínas transmembranales como los receptores tipo Toll (TLRs) y los receptores de lectina tipo C (CTRs), así como proteínas citoplásmicas como los receptores tipo NOD (dominio de oligomerización por unión de nucleótidos) (NLRs) y los receptores tipo RIG-I (gen I inducible por ácido retinoico) (RLRs). De estas categorías, los TLRs son las moléculas mejor descritas y estudiadas en MCs.

³ El equivalente a la activación directa anteriormente descrita.

1.2.1 Estructura y función de los receptores tipo Toll expresados en MCs.

Los TLRs son proteínas transmembranales de tipo I con un ectodominio rico en repeticiones de leucina (LRR), responsable del reconocimiento de los PAMPs, un dominio transmembranal y un dominio intracelular homólogo al dominio del receptor de interleucina 1 (IL-1) (TIR) (Medzhitov, Preston-Hurlburt, & Janeway, 1997; Rock, Hardiman, Timans, Kastelein, & Bazan, 1998). Actualmente, se han identificado 10 miembros (TLR1-10) en seres humanos y 12 (TLR1-9 y TLR11-13) en el genoma murino (Lee, Avalos, & Ploegh, 2012), siendo el TLR-2 y el TLR-4 los más estudiados. Cada TLR tiene como ligando un componente específico de origen microbiano, *e.g.* el TLR-4 reconoce al lipopolisacárido (LPS)⁴, la proteína F del virus respiratorio sincicial (RSV), la proteína 60 de choque térmico (HSP60) de *Chlamydia pneumoniae*, entre otros (Molteni, Gemma, & Rossetti, 2016).

Los TLRs funcionales difieren en su localización celular. Por ejemplo, los TLR-1, -2, -4, -5 y -6 se expresan mayoritariamente en la superficie celular y reconocen componentes de la membrana plasmática de los patógenos (Kawai & Akira, 2011), mientras que los TLR-3, -7, -8 y -9 se expresan exclusivamente en vesículas intracelulares y reconocen ácidos nucleicos (Blasius & Beutler, 2010). Aunque la mayoría de los TLRs señalizan como homodímeros, el TLR-2 forma heterodímeros con los TLR1 y -6 (Jin *et al.*, 2007). De forma general, los TLRs que se localizan en vesículas intracelulares existen como dímeros preformados inactivos (Tanji, Ohto, Shibata, Miyake, & Shimizu, 2013), mientras que los TLRs localizados en la superficie celular permanecen como unidades monoméricas y sólo la unión con su ligando induce tanto la dimerización (Jin *et al.*, 2007; Gay, Symmons, Gangloff, & Bryant, 2014), como su respectiva activación.

En las MCs, los TLRs son conocidos por su papel relevante con diferentes PAMPs *in vivo* (Supajatura *et al.*, 2002). En especial, la acción del LPS sobre las MCs derivadas de la cavidad peritoneal, depende de la presencia del TLR-4 funcional (Supajatura *et al.*, 2001), con lo cual, la función fisiológica de este receptor cobra una importancia muy relevante en la inmunidad innata.

⁴ El componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas.

1.2.2 Vías de transducción del receptor TLR-4.

A diferencia del resto de los TLRs, el sistema de transducción del TLR-4 requiere de la colaboración de una proteína acarreadora, denominada proteína de unión al LPS (LBP), y de dos correceptores, CD14 y MD2 (factor 2 de diferenciación mieloide). Brevemente, el proceso de reconocimiento del LPS por el TLR-4 es el siguiente: el LPS unido a la LBP interactúa con CD14, el cual, a su vez transfiere el ligando al complejo formado por el TLR-4 y MD2 (Figura 2) (Gioannini *et al.*, 2004; Wright, Ramos, Tobias, Ulevitch, & Mathison, 1990).

Dos grandes vías de señalización se activan a través del TLR-4. La primera de ellas requiere del adaptador MyD88 (factor 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide) y culmina con la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , -6 y -12, entre otras). Esta vía dependiente de MyD88 señala a través de los factores de transcripción NF κ B (factor nuclear kappa B), complejo AP-1 (proteína 1 activadora) e IRF-5 (factor regulador 5 de interferón) (Lee *et al.*, 2012; Gay *et al.*, 2014). La vía independiente de MyD88 recluta a los adaptadores TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR inductor de interferón beta) y TRAM (molécula adaptadora relacionada con TRIF), señala por medio del factor de transcripción IRF3 (factor regulador 3 de interferón) y culmina con la síntesis de interferón beta (IFN β) e IL-10 (Figura 2).

1.3 Mecanismos de Desgranulación en las MCs: Comparación entre la Desgranulación Anafiláctica y la Desgranulación Picemal

El fenotipo granular de las MCs está plenamente asociado con una de sus funciones primordiales, que es contar con un reservorio de mediadores listos para ser liberados frente a un estímulo adecuado, proceso denominado como desgranulación (Wernersson & Pejler, 2014). De hecho, el inicio de las respuestas inmunes, innata y adaptativa, depende de la descarga de mediadores proinflamatorios en el sitio de la infección, en la cual las MCs representan uno de los elementos necesarios para el desarrollo de este microambiente inflamatorio (Cardamone *et al.*, 2016).

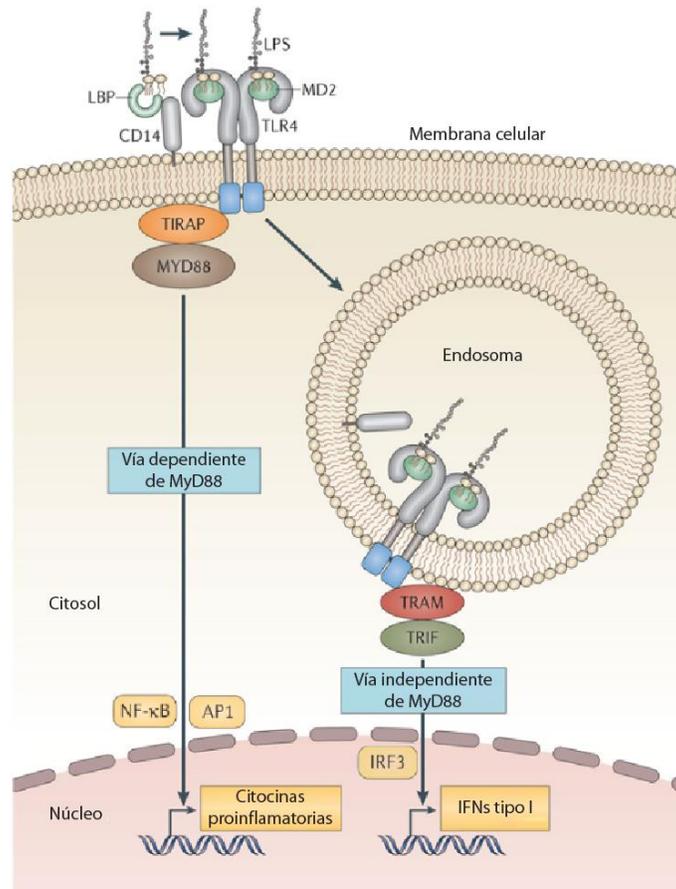


Figura 2. Sistema de señalización del receptor Toll tipo 4. El lipopolisacárido (LPS) induce la dimerización del TLR4-MD2 e inicia el reclutamiento y ensamblaje de complejos de señalización constituidos por proteínas adaptadoras que contienen dominios similares al receptor de IL-1 (TIR). Uno de los complejos se forma por la asociación entre TIRAP y MyD88. Esta vía activa a los factores de transcripción NFκB, AP-1 e IRF5 y tiene un papel importante en la expresión de diversas citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β, -6 e -12). El otro complejo se forma por la unión entre TRAM y TRIF, una vez que el TLR4 es internalizado en endosomas. Esta vía independiente de MyD88 activa al factor de transcripción IRF3 y resulta en la expresión de IFNβ e IL-10. AP-1, proteína 1 activadora; IL, Interleucina; IFN, interferón; IRF, factor regulador de interferón; MD2, factor 2 de diferenciación mieloide; MyD88, factor 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide; NFκB, factor nuclear kappa B; TIRAP, proteína adaptadora que contiene el dominio del receptor Toll/IL-1; TNF-α, factor alfa de necrosis tumoral; TRAM, molécula adaptadora relacionada con TRIF; TRIF, adaptador que contiene el dominio TIR inductor de IFN-beta. Adaptada de “Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis,” por B. D. Needham, y M. S. Trent, 2013, *Nature Reviews Microbiology*, 11, p. 474; “The history of Toll-like receptors – redefining innate immunity,” por L. A. O’Neil, D. Golenbock, y A. G. Bowie, 2013, *Nature Reviews Immunology*, 13, p. 456.

Actualmente se han descrito dos mecanismos principales de desgranulación en las MCs: la desgranulación anafiláctica (AND) y la desgranulación picemal (PMD), definidos de acuerdo con criterios o cambios ultraestructurales citoplasmáticos y granulares (Crivellato, Nico, Mallardi, Beltrami, & Ribatti, 2003). La AND comprende la liberación del contenido granular después de la fusión gránulo-gránulo y/o gránulo-membrana plasmática (Dvorak *et al.*, 1991). Tales eventos son mediados por la interacción entre varias v-SNAREs (del inglés, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) presentes en la membrana del gránulo y las t-SNAREs localizadas en la membrana plasmática o en algún otro gránulo (Woska & Gillespie, 2012). El estímulo mejor estudiado en MCs y que da por resultado la AND es el que produce el complejo antígeno/ IgE (Galli *et al.*, 2005), el cual depende del entrecruzamiento del receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI).

Por otra parte, la PMD se define como el vaciamiento progresivo del contenido granular en ausencia de la fusión gránulo-gránulo y/o gránulo-membrana plasmática (Dvorak *et al.*, 1992). En comparación con la AND, poco se conoce sobre la maquinaria molecular que subyace a la PMD, sin embargo, se ha propuesto que el mecanismo de la PMD consiste en la generación de pequeñas vesículas o gemas, producidas a partir del gránulo, las cuales contienen los mediadores que serán transportados y liberados (Crivellato, Nico, Gallo, & Ribatti, 2010).

Es importante hacer notar que la activación o estimulación de las MCs no necesariamente induce la AND. Por ejemplo, muchos productos bacterianos, incluyendo ligandos de los TLRs tales como el LPS o el poli I:C (ligando del TLR-3), o toxinas como la toxina del cólera, producen la liberación de citocinas sin una AND observable (Kulka, Alexopoulou, Flavell, & Metcalfe, 2004; Matsushima, Yamada, Matsue, & Shimada, 2004; Supajatura *et al.*, 2002; Zhu & Marshall, 2001). En particular, la secreción del TNF-α preformado, mediada por la activación del TLR-4, ocurre en ausencia de la liberación de la enzima β-hexosaminidasa, considerada como el marcador de la AND (Supajatura *et al.*, 2002).

1.4 Universalidad vs Especificidad de la Señal de Ca²⁺ en Células Eucariontes

La universalidad de la señal de Ca²⁺ resulta evidente en cualquier sistema biológico. Sin embargo, durante los últimos años ha quedado bastante claro que estos mismos sistemas requieren de mecanismos de transducción de señales más complejos, que el simple incremento en la concentración de segundos mensajeros, que les permitan otorgarle especificidad a la respuesta. Dentro de los mecanismos que se han propuesto como complemento para la generación de respuestas más complejas se encuentran la localización espaciotemporal de los elementos de las vías de señalización (Berridge, Lipp, & Bootman, 2000), otorgándole una atención especial a las proteínas de andamiaje (Shaw & Filbert, 2009).

1.4.1 Las proteínas de andamiaje como intermediarios en la generación de respuestas complejas: AHNAK1 como ejemplo.

Las proteínas de andamiaje se pueden definir como aquellas proteínas que son capaces de interactuar simultáneamente con dos o más elementos de las vías de señalización, a través de varias interacciones proteína-proteína⁵ (Shaw & Filbert, 2009). Estas proteínas pueden, en principio, ejercer las siguientes funciones: a) actuar como plataformas para el ensamblaje de moléculas, b) distribuir moléculas de señalización en sitios específicos, c) coordinar señales de retroalimentación positiva/ negativa, d) proteger de la degradación a las moléculas de señalización (Shaw & Filbert, 2009). Esta diversidad funcional se encuentra determinada por su estructura altamente modular, la cual además provee versatilidad a las vías de señalización (Bhattacharyya, Reményi, Yeh, & Lim, 2006).

Debido a su complejidad y versatilidad, las respuestas mediadas por Ca²⁺ representan el ejemplo idóneo de cómo su diversidad puede ser entendida no sólo a partir del señalosoma, sino de su localización espaciotemporal – ejemplificada por los microdominios de Ca²⁺ – en la cual están implicadas diversas proteínas de unión a Ca²⁺ (v.g. CaM, calmodulina, o CaMKII, proteína cinasa II dependiente de Ca²⁺/calmodulina) (Kobayashi, Yamada, Fukao, Tsutsuura, & Tohse, 2007) y ciertas proteínas de andamiaje,

⁵ En la literatura científica es posible encontrar el término proteína adaptadora como sinónimo de proteína de andamiaje. En los casos en que los autores determinen diferencias entre ambos siempre resultan ser mínimas e imprecisas.

entre las que destaca AHNAK1 por su papel en la disponibilidad de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática en células no excitables (Matza *et al.*, 2008).

AHNAK1⁶, también denominada desmoyosina, es una proteína de andamiaje de aproximadamente 700 kDa, que participa en diversos procesos celulares como la migración, arquitectura celular, reparación de membrana y modulación de canales iónicos. AHNAK1 presenta una estructura tripartita con un extremo amino terminal (N-terminal) de 251 aminoácidos, un dominio central de aproximadamente 4300 aminoácidos distribuidos en elementos repetitivos de 128 residuos y un extremo carboxilo terminal (C-terminal) constituido por 1002 aminoácidos (Figura 3) (Shtivelman, Cohen, & Bishop, 1992). AHNAK1 pertenece a la familia de proteínas AHNAK, integrada además por AHNAK2, la cual comparte la estructura tripartita y el elevado peso molecular de AHNAK1 (Komuro *et al.*, 2004). Sin embargo, se desconocen las funciones específicas de AHNAK2.

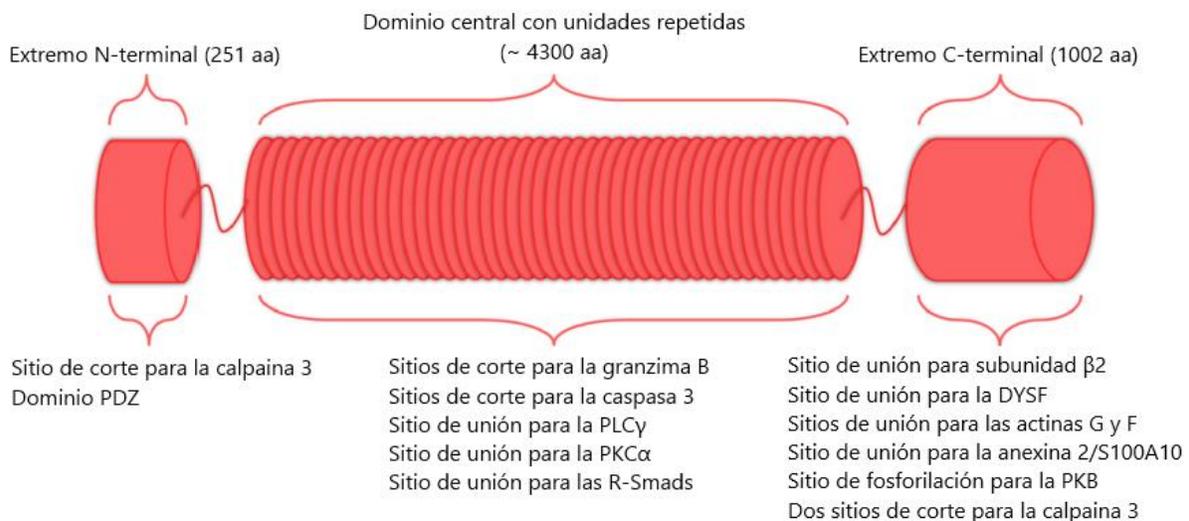


Figura 3. Estructura de AHNAK1. AHNAK1 es una proteína de andamiaje con una organización tripartita y una estructura altamente modular. Se indican varios de sus sitios de corte y unión. aa, aminoácidos; DYSF, disferlina; PDZ, PSD95/Discs-large/ZO1; PLC γ , fosfolipasa C gamma; PKB, proteína cinasa B; PKC α , proteína cinasa C alfa; R-Smads, proteínas Smad reguladoras. Adaptada de “AHNAK: The giant Jack of all trades,” por T. A. Davis, B. Loos, y A. M. Engelbrecht, 2014, *Cellular Signalling*, 26, p. 2.

Estudios recientes han demostrado que en cardiomiocitos la proteína AHNAK1 se asocia con la subunidad β de los canales de Ca^{2+} tipo L (LTCC) (véase más adelante) en la

⁶ El nombre deriva del hebreo, que significa gigante.

membrana plasmática y es fosforilada por la proteína cinasa A (PKA), en respuesta a la activación de los receptores β -adrenérgicos (Haase *et al.*, 2005). Por otra parte, en células no excitables como los linfocitos T, se ha demostrado que AHNAK1 es importante para la señalización eficiente de Ca^{2+} y la activación del factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT), debido a su participación en la translocación de los LTCC hacia la membrana plasmática, probablemente a través de su interacción con la subunidad β_2 de los LTCC (Matza *et al.*, 2008). En MCs, la adición de LPS induce la asociación de las isoformas clásicas de la proteína cinasa C (PKC α/β) con la fosfatasa 2A (PP2A) y su correspondiente disociación de AHNAK1 (Martín-Ávila *et al.*, 2016). Si bien se reconoce la participación de AHNAK1 en el sistema de transducción de señales del TLR-4, su función específica en MCs se desconoce, por lo que resulta plausible que AHNAK1 participe en la distribución de los LTCC y en la regulación de la señal mediada por Ca^{2+} en MCs.

1.5 El Ca^{2+} en la Secreción de Mediadores en MCs

El Ca^{2+} es un segundo mensajero versátil que regula una gran variedad de mecanismos celulares como la proliferación, diferenciación, excitabilidad, exocitosis y apoptosis (Berridge *et al.*, 2000; Clapham, 2007). Tiene la particularidad de no ser sintetizado por las células, ya que no puede ser modificado químicamente y, para regular su función, la célula debe quelarlo o compartimentalizarlo.

Como se mencionó en párrafos anteriores, la activación de las MCs puede producir la desgranulación y/o la síntesis *de novo* de citocinas y de mediadores derivados del ácido araquidónico. Todos estos procesos requieren, en mayor o en menor grado, de un incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De hecho, la AND inducida en MCs por el entrecruzamiento del receptor Fc ϵ RI constituyó uno de los primeros fenómenos biológicos dependientes de Ca^{2+} descritos (Foreman, Mongar, & Gomperts, 1973; Kanno, Cochrane, & Douglas, 1973) y además, mantenidos por la polaridad de la membrana plasmática (Mohr & Fewtrell, 1987).

Respecto a las vías implicadas en la movilización de Ca^{2+} , se considera que la entrada de Ca^{2+} extracelular es absolutamente necesaria para el proceso de la AND (Beaven *et al.*, 1984; Church, Pao, & Holgate, 1982; Foreman, Hallett, & Mongar, 1977b, 1977a). En este mismo sentido, se ha demostrado que el grado de liberación de la histamina se

correlaciona con la cantidad de Ca^{2+} (Foreman *et al.*, 1977b) o Sr^{2+} (Hide & Beaven, 1991)⁷ introducidos en las MCs. Además, dicha liberación se bloquea efectivamente por bajas concentraciones de lantano (La^{3+}) o manganeso (Foreman & Mongar, 1973), confirmando que ciertos canales de Ca^{2+} participan en la secreción de mediadores en MCs.

Otro de los procesos estrictamente dependiente de Ca^{2+} es el reclutamiento de las isoformas clásicas de la proteína cinasa C (PKC) y de los componentes de la vía de señalización ERK/cPLA₂/5-LOX (cinasa regulada por señales extracelulares/fosfolipasa A₂ citosólica/5-lipoxigenasa) inducidos por diversos agonistas (Chang, Nelson, & Parekh, 2006; Chang, Di Capite, Nelson, & Parekh, 2007).

Además de inducir la AND, el entrecruzamiento del receptor FcεRI conduce a la síntesis *de novo* de varias citocinas, incluido el TNF-α. En una línea celular obtenida de la leucemia basofílica de rata (RBL), tanto la producción como la secreción del TNF-α dependen de la movilización de Ca^{2+} (Baumgartner, Yamada, Deramo, & Beaven, 1994a). La transcripción de este tipo de citocinas proinflamatorias depende en parte de la activación de la vía Ca^{2+} /calcineurina/NFAT (Andrade *et al.*, 2011).

Finalmente, una de las características menos estudiadas del proceso de secreción, pero sumamente interesante, es la existencia de una liberación de mediadores preferencial en función de la amplitud y duración de la señal de Ca^{2+} , por ejemplo, entre la histamina y la PGD₂ (van Haaster *et al.*, 1995).

1.6 Mecanismos de Movilización de Ca^{2+} en MCs

1.6.1 Entrada de Ca^{2+} dependiente del vaciamiento de almacenes intracelulares: adiós al canon.

El mecanismo canónico de internalización de Ca^{2+} en células clásicamente consideradas como no excitables, como las MCs, corresponde a la entrada de Ca^{2+} dependiente del vaciamiento de almacenes intracelulares (SOCE) (Parekh & Penner, 1997; Parekh & Putney, 2005). Los canales que median este proceso son activados por el vaciamiento del retículo endoplásmico (ER), a través de la acción de segundos mensajeros que promueven la movilización intracelular de Ca^{2+} (Putney, Broad, Braun, Lievremont, & Bird, 2001), siendo el inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) un componente esencial de este proceso (Putney,

⁷ Actúa como ion sustituto de Ca^{2+} .

1987). La activación de estos canales, además, se puede inducir farmacológicamente a través de compuestos, como la taspigargina (Tg), que inhiben la acción de la ATPasa- Ca^{2+} del ER (SERCA) (Alvarez, Montero, & Garcia-Sancho, 1994).

La SOCE, definida en términos electrofisiológicos, generalmente se asocia con la corriente prototipo que pasa a través de los canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+} (CRAC), I_{CRAC} (Hoth & Penner, 1992). El aparato molecular que media la I_{CRAC} consiste básicamente de dos elementos: la molécula 1 de interacción estromal (STIM1) y el modulador 1 de Ca^{2+} activado por la liberación de Ca^{2+} (ORAI1). STIM1 sensa la depleción en la $[\text{Ca}^{2+}]$ del ER (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005) e interacciona con la subunidad que constituye el poro del canal, ORAI1, localizada en la membrana plasmática (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006; S. L. Zhang *et al.*, 2006).

La SOCE, al igual que la entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje (VOCE), fueron mecanismos inicialmente clasificados en función de la excitabilidad celular. De esta manera, el canon dictaba que las células no excitables *estaban condenadas* al uso de la SOCE, mientras que las células excitables podían, en principio, recurrir a la entrada de Ca^{2+} independiente de voltaje, ya que este tipo de corriente había sido identificada en neuronas (Mathes & Thompson, 1994).

No obstante, actualmente se reconoce que las MCs utilizan mecanismos independientes de la SOCE que se encuentran involucrados en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y, por tanto, en la regulación de las respuestas descritas. En particular, se ha demostrado que la activación del receptor FcεRI, pero no la Tg, induce la entrada de Ca^{2+} por un mecanismo independiente de la SOCE (Suzuki, Yoshimaru, Inoue, Nunomura, & Ra, 2008). Este mecanismo es poco sensible al 2-aminoetoxifenil borato (2-APB) y al SK&F96365, ambos antagonistas de la SOCE, lo cual implica que estos canales de Ca^{2+} son distintos a los que median la I_{CRAC} .

1.6.2 Entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje: ¿marcadores de la excitabilidad?

Una vez establecida la caracterización molecular de la I_{CRAC} , se ha vuelto bastante claro que, más allá de la SOCE, las células no excitables y, en específico, las células del sistema inmune, deben poseer un vasto conjunto de canales iónicos que permitan regular con fineza la complejidad de las respuestas mediadas por Ca^{2+} (Matza *et al.*, 2008). Evidencia reciente

sugiere que este conjunto incluye a componentes de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje (Ca_v), originalmente considerados como el marcador molecular de la excitabilidad (Davenport, Li, Heizer, Schmitz, & Perraud, 2015), así como miembros de la familia de receptores de potencial transitorio (TRPs) (Ma *et al.*, 2008; Schappe *et al.*, 2018).

1.6.2.1 Clasificación de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje.

Los Ca_v median la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular en respuesta al cambio en el potencial de membrana o despolarización. Estos canales son ubicuos en las células excitables, donde actúan como transductores al convertir una señal eléctrica – despolarización – en una señal química – incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En general, no se inactivan rápidamente, con lo cual se favorece la entrada sostenida de Ca^{2+} . Esta característica se considera indispensable para el mantenimiento de la secreción en glándulas secretoras y órganos endocrinos (Conley, Brammar, & Brammar, 1999).

Originalmente, los Ca_v se clasificaron en base a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas. Una de las características biofísicas más relevantes fue el grado o umbral de despolarización necesario para su activación (Hagiwara, Ozawa, & Sand, 1975; Llinás & Yarom, 1981). De acuerdo con este criterio, se propusieron dos categorías: a) canales de Ca^{2+} activados por una despolarización elevada (HVA) y; b) canales de Ca^{2+} activados por una despolarización baja (LVA) (Figura 4). Análisis farmacológicos posteriores permitirían una clasificación más exhaustiva que incluiría a cinco clases o tipos de canales: T (LVA), N, P/Q, R y L (todos HVA) (Nowycky, Fox, & Tsien, 1985; Llinás, Sugimori, Lin, & Cherksey, 1989; Randall & Tsien, 1995; Bourinet *et al.*, 1999) (Figura 4).

A mediados de la década de 1990 se propuso una nomenclatura clonal como sistema de clasificación (Birnbaumer *et al.*, 1994). Este esquema se basó en la clonación de los cDNA (ADN complementario) que codifican para los distintos tipos de canales, en particular la subunidad α_1 que conforma el poro del canal (véase más adelante), siguiendo la terminología acuñada por Snutch *et al.* (1990), *i.e.* clase A, B, C, etc. (Figura 4). Actualmente, la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) sugiere el uso de una nomenclatura sistemática o racional, similar a la propuesta para los canales de potasio (K^+) activados por voltaje (K_v) (Catterall, Perez-Reyes, Snutch, & Striessnig, 2005; Ertel *et al.*, 2000). De acuerdo con este sistema, los canales de Ca^{2+} se nombran utilizando el símbolo

químico del principal ion que permean (Ca^{2+}), seguido del regulador fisiológico (voltaje) como subíndice (Ca_v). Además, se emplean identificadores numéricos (1-3) que corresponden a la subfamilia genética de la subunidad α_1 (Ertel *et al.*, 2000). Por tanto, la subfamilia Ca_v1 ($\text{Ca}_v1.1 - \text{Ca}_v1.4$) incluye a los canales con las subunidades α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} , que median corrientes de Ca^{2+} tipo L (Figura 4).

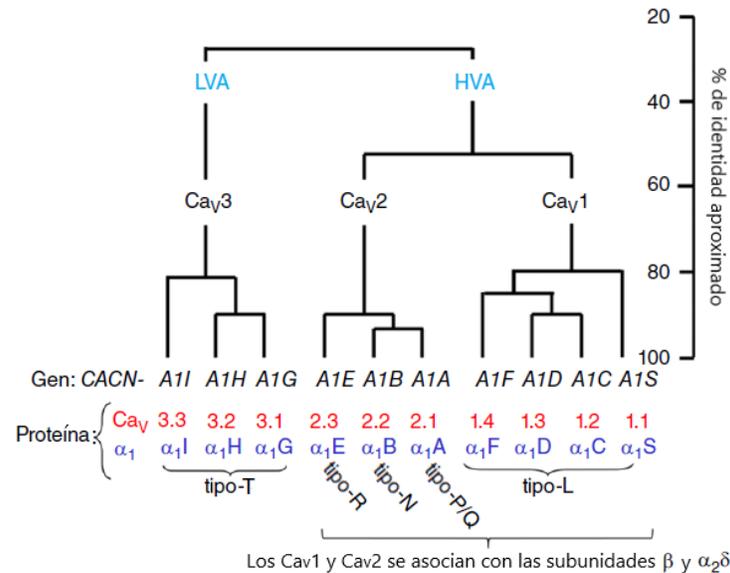


Figura 4. Homología de la subunidad α_1 de los Ca_v . Se muestra la relación filogenética entre los 10 tipos de subunidades α_1 de los Ca_v , codificados por los genes CACNA1x . Se indican las nomenclaturas fenomenológicas (HVA y LVA; T, R, N, P/Q y L), clonal (α_{1S} , α_{1C} , etc.) y sistemática ($\text{Ca}_v x,y$). HVA, canales de Ca^{2+} activados por una despolarización elevada. LVA, canales de Ca^{2+} activados por una despolarización baja. Adaptada de “Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology,” por A. C. Dolphin, 2016, *The Journal of Physiology*, 594, p. 5371.

1.6.2.2 Estructura de los Ca_v .

Los Ca_v pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por voltaje, entre los que se incluyen a los canales de sodio (Na^+) y potasio (K^+), Na_v y K_v respectivamente (Yu & Catterall, 2004). Los Ca_v están constituidos por una subunidad α_1 , codificada por los genes CACNA1x , de los cuales se han identificado 10 tipos en mamíferos (Figura 4) (Catterall *et al.*, 2005). Los Ca_v1 y Ca_v2 son capaces de formar complejos multiméricos constituidos por una subunidad α_1 o poro del canal, una subunidad extracelular α_2/δ , una subunidad

citoplasmática β y, al menos en músculo esquelético, una subunidad transmembranal γ (Figura 5) (Takahashi, Seagar, Jones, Reber, & Catterall, 1987).

1.6.2.2.1 Subunidad α_1 : poro del canal.

La subunidad α_1 de los Ca_v dicta las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de estos canales. La estructura primaria de la subunidad α_1 consta de cuatro dominios homólogos (I-IV) concatenados, constituidos por seis hélices transmembranales (S1-S6) (Figura 5A) (Tanabe *et al.*, 1987). Recientemente se demostró, mediante estudios de criomicroscopía electrónica, que los dominios I-IV están organizados en el sentido de la manecillas del reloj (Figura 5B) (Wu *et al.*, 2015, 2016). Las hélices S1-S4 de cada motivo homólogo conforman el dominio sensor de voltaje (VSD), de las cuales, la hélice S4 contiene residuos de arginina (R) y lisina (K) cargados positivamente en cada tercera o cuarta posición, representando el sensor de voltaje (Figura 5A-B) (Wu *et al.*, 2015, 2016). Las hélices S5-S6 y las asas que las conectan (asas P) constituyen el poro del canal. A su vez, el filtro de selectividad está constituido por un sitio extracelular del dominio transmembranal (TMD) que comprende un locus EEEE (ácido glutámico) (Ellinor, Yang, Sather, Zhang, & Tsien, 1995).

1.6.2.2.2 Subunidad β .

Si bien la subunidad α_1 constituye la unidad estructural y funcional mínima de los Ca_v , las subunidades accesorias β y $\alpha_2\gamma$ modifican sus propiedades biofísicas e incrementan la localización del poro del canal en la membrana plasmática (Dolphin, 2012).

Hasta ahora se han identificado cuatro subunidades β (1-4), codificadas por los genes *CACNB1-4*. La estructura primaria de la subunidad β consta de una región central, altamente conservada, flanqueada por extremos carboxilo y amino variables (De Waard, Pragnell, & Campbell, 1994; Birnbaumer *et al.*, 1998; Hanlon, Berrow, Dolphin, & Wallace, 1999). A su vez, la región central está constituida por los dominios de homología a Src 3 (SH3) y el dominio guanilato cinasa (GK), conectados por una región HOOK (Chen *et al.*, 2004; Van Petegem, Clark, Chatelain, & Minor, 2004).

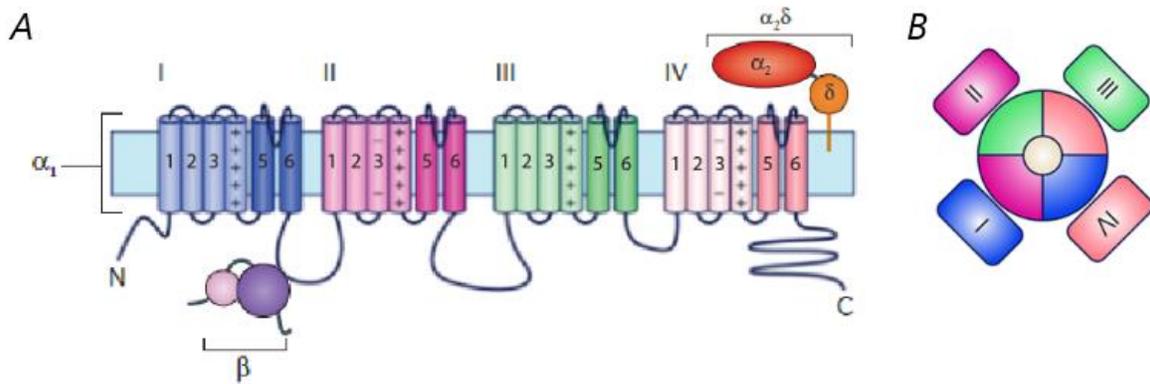


Figura 5. Estructura de los Cav. (A), la subunidad α_1 consta de 24 hélices transmembranales (S, cilindros) organizadas en cuatro dominios homólogos (I-IV). Las hélices S1-S4 de cada dominio constituyen el dominio sensor de voltaje (VSD). El dominio de poro (PD) comprende las hélices S5-S6 y el asa que los conecta (asa P). Las hélices S4 de cada dominio (múltiples +) constituyen el sensor de voltaje. La subunidad β interacciona con el asa intracelular que conecta los dominios I y II de la subunidad α_1 . La subunidad $\alpha_2\delta$ consta de una subunidad extracelular α_2 unida por medio de un puente disulfuro a la subunidad transmembranal δ . (B), vista superior de la subunidad α_1 . El modelo es una organización pseudotetramérica, mostrando al centro el poro del canal y en la periferia a los VSD (I-IV). Adaptada de “Calcium channel auxiliary $\alpha_2\delta$ and β subunits: Trafficking and one step beyond,” por A. C. Dolphin, 2012, *Nature Reviews Neuroscience*, 13, p. 545; “How and why are calcium currents curtailed in the skeletal muscle voltaje-gated calcium channels,” por B. E. Flucher, y P. Tuluc, 2017, *The Journal of Physiology*, 595, p. 1453.

La asociación entre las subunidades α_1 y β se establece entre el dominio de asociación α (AID), localizado en el asa intracelular que conecta a los dominios I y II de la subunidad α_1 (Pragnell *et al.*, 1994; De Waard, Witcher, Pragnell, Liu, & Campbell, 1995), y el bolsillo de unión al AID (ABP) situado en el dominio GK de la subunidad β (Chen *et al.*, 2004; Van Petegem *et al.*, 2004). Una de las principales consecuencias de esta interacción sobre la función de los Ca_v es el incremento en la localización de la subunidad α_1 sobre la superficie celular. Entre los mecanismos responsables de este incremento, se ha propuesto que la interacción entre ambas subunidades induce un cambio conformacional entre las asas intracelulares de la subunidad α_1 , que sustituye la señal de retención en el ER, por una señal de liberación, favoreciendo su translocación membranar (Fang & Colecraft, 2011). Otra serie de estudios propone que la subunidad β previene la ubiquitinación y degradación de la subunidad α_1 por el proteosoma (Altier *et al.*, 2011; Waithe, Ferron, Page, Chaggar, & Dolphin, 2011).

1.6.2.3 Canales de Ca^{2+} tipo L.

La familia Ca_v1 está constituida por cuatro miembros ($Ca_v1.1-1.4$) codificados por los genes *CACNA1S*, *-C*, *-D* y *-F* (Figura 3). Los Ca_v1 también se denominan LTCC o receptores de dihidropiridinas (DHPR), en alusión a sus corrientes entrantes de larga duración y su alta sensibilidad a las 1,4-dihidropiridinas (DHP), respectivamente (Nowycky *et al.*, 1985). Las DHP pueden actuar como agonistas (v.g. BayK8644) o antagonistas (v.g. nifedipina) de los LTCC al modular alostéricamente la subunidad α_1 , desplazando el equilibrio hacia los estados abierto (agonista) o cerrado (antagonista). Los sitios de unión de las DHP a la subunidad α_1 comprenden los residuos de aminoácidos localizados en la hélice S6 de los dominios III y IV y la hélice S5 del dominio III (Hockerman, Peterson, Johnson, and, & Catterall, 1997; Hofmann, Lacinová, & Klugbauer, 1999; Tang *et al.*, 2016).

A pesar de que los LTCC comparten sus propiedades farmacológicas, difieren en su distribución tisular. Los $Ca_v1.1$ y los $Ca_v1.4$ se expresan primordialmente en el músculo esquelético y en la retina, respectivamente. En contraste, la expresión de los $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ es más ubicua en células excitables e incluso pueden expresarse simultáneamente en la misma célula (Zamponi, Striessnig, Koschak, & Dolphin, 2015).

Aunque es bien conocido que las células del sistema inmune no sufren una despolarización masiva de la membrana plasmática, existe evidencia suficiente para afirmar que los LTCC están presentes en células no excitables. Los primeros estudios farmacológicos que sugirieron la participación de los LTCC en células del sistema inmune se realizaron en linfocitos T. En estos experimentos *in vitro* se demostró que antagonistas de los LTCC bloquean la proliferación de los linfocitos T humanos o células mononucleares de sangre periférica o bien, disminuyen el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ al ser estimuladas con mitógenos (Birx, Berger, & Fleisher, 1984; Gelfand, Cheung, Grinstein, & Mills, 1986; Dupuis, Aoudjit, Ricard, & Payet, 1993). Estudios posteriores han revelado que en MCs derivadas de médula ósea (BMDCs) y RBL-2H3 se expresan cantidades considerables del RNA mensajero (RNA_m) para la subunidad α_{1C} del $Ca_v1.2$ y, en menor cantidad, para la subunidad α_{1D} del $Ca_v1.3$ (Yoshimaru, Suzuki, Inoue, & Ra, 2009). Además, se ha demostrado que la subunidad α_{1C} se expresa en la superficie de las MCs (Yoshimaru *et al.*, 2009).

2. Planteamiento del Problema

La mayoría de nuestras concepciones relacionadas con el proceso de exocitosis en MCs, particularmente el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, provienen de estudios de la activación del receptor FcεRI. No obstante, la información que existe sobre los mecanismos transduccionales que conectan la activación del receptor TLR-4 con la secreción de TNF-α es escasa. De hecho, el mecanismo canónico de señalización del TLR-4 vigente se reduce a la inducción de la síntesis *de novo* de citocinas, a través del factor de transcripción NF-κB. Ese mecanismo sugiere de manera implícita, que la estimulación de las MCs por el LPS da como resultado una producción efectiva de citocinas en ausencia de la liberación del contenido granular.

Al confrontar la tesis anterior con las evidencias experimentales disponibles resulta bastante obvio que nuestro marco de referencia es insuficiente para explicar la secreción del TNF-α inducida por LPS.

De esta forma, en esta tesis abordamos el sistema de transducción de señales que subyace a la liberación del TNF-α inducida por la estimulación del TLR-4 en MCs. En particular, caracterizamos la participación de los LTCC y de la proteína AHNAK1 en la movilización de Ca^{2+} en BMMCs. Para ello, evaluamos la participación de los LTCC en el acoplamiento estimulación-secreción inducida por LPS en las BMMCs, utilizando antagonistas selectivos de dichos canales. De igual manera, caracterizamos electrofisiológicamente la corriente mediada por los LTCC en BMMCs, para finalmente determinar la localización de la proteína AHNAK1 y de las subunidades α y β de los LTCC.

3. Hipótesis

1. El LPS inducirá la aparición de una corriente mediada por los LTCC en MCs, contribuyendo a la entrada de Ca^{2+} extracelular necesaria para la secreción del TNF- α estimulada por LPS.
2. La proteína AHNAK1 participará en la expresión membranal de la subunidad β de los LTCC en MCs.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Caracterizar el papel de los LTCC y de la proteína AHNAK1 en el sistema de transducción de señales que se activa por el LPS en las MCs.

4.2 Objetivos Particulares

Utilizando BMBCs:

1. Analizar la participación de los LTCC en la secreción de TNF- α estimulada por LPS.
2. Evaluar la activación de los LTCC en respuesta a la estimulación por LPS.
3. Determinar la localización celular de la proteína AHNAK1 y de las subunidades α y β de los LTCC en BMBCs tratadas con LPS.

5. Materiales y Métodos

5.1 Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6J (25-35 g) (stock 000664, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) de sexo indistinto, alimentados con dieta comercial estándar y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 h, 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) Institucional del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional.

5.2 Cultivo de BMMCs

Se extrajo la médula ósea del fémur de los ratones y se cultivó en medio RPMI 1640 (HEPES 20 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 5.6 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con: suero fetal bovino (FBS) al 10 %, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin (todos de Gibco) y albúmina sérica bovina (BSA) al 0.05 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Adicionalmente, se agregaron 20 ng/mL de IL-3 (PreproTech, Rocky Hill, NJ) 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 resuspendiéndolas en medio de cultivo fresco a una concentración mínima de 1×10^6 células/ mL. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora Binder a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 %.

En cada uno de los experimentos se utilizaron cultivos de 5-6 semanas. De manera rutinaria, las BMMCs se sensibilizaron con 100 ng/mL de IgE monoclonal anti-DNP (clona SPE-7) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 18-24 h a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron con medio de cultivo fresco o solución Tyrode/BSA (HEPES 20 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 5.6 mM y 0.5 g/L de albúmina bovina (BSA) [pH 7.4]) (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

5.3 Cuantificación de la Secreción de TNF- α

Las BMMCs sensibilizadas se resuspendieron en medio de cultivo fresco a una densidad final de 2×10^6 células/ mL a 37 °C. Se efectuaron cursos temporales de estimulación con 500 ng/mL de LPS serotipo 026:B6 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a tiempos: 0, 2 y 4 h. Posteriormente, las células estimuladas se centrifugaron a 5000 revoluciones por minuto (rpm), durante 5 min, a 4 °C. Los sobrenadantes se decantaron y almacenaron a – 80 °C hasta la cuantificación del TNF- α , mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Para el grupo pretratado con nifedipina (10 μ M), esta se adicionó 15 min antes de la estimulación con LPS a 37 °C. La recolección de los sobrenadantes se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Finalmente, el TNF- α secretado se cuantificó mediante el kit de ELISA N° cat. 900-K54 (PreproTech, Rocky Hill, NJ), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

5.4 Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal

Las BMMCs sensibilizadas se resuspendieron en medio de cultivo fresco a una densidad final de 1×10^6 células/ mL a 37 °C. Se efectuaron cursos temporales de estimulación con 500 ng/mL de LPS serotipo 026:B6 a los siguientes tiempos: 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h. Posteriormente, las células estimuladas se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS) a una densidad final de 1×10^6 células/ condición a 37 °C.

Una vez concluido el proceso de lavado, las BMMCs se transfirieron a una laminilla electrocargada y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), durante 20 min, a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS 1X, las células se incubaron con solución de bloqueo [3 % de BSA, 5 % de suero de burro (Biowest, Riverside, MO) y 0.1 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disueltos en PBS 1X] durante 2 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios disueltos en solución de bloqueo, durante toda noche a 4 °C.

Para determinar la colocalización entre la subunidad accesoria de los LTCC y la proteína de andamiaje, se incubó en primera instancia el anticuerpo primario para la

subunidad β_2 de los LTCC (Alomone Labs, Jerusalén), a una dilución de 1:1000, seguido por el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488, anti-ratón IgG H+L (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), a una dilución de 1:500. Cumplido lo anterior, se realizó un doble marcaje empleando el anticuerpo primario para la proteína AHNAK1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) y su respectivo anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 anti-conejo IgG H+L (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), ambos a una dilución de 1:500.

De manera paralela, un segundo grupo de células se incubó con el anticuerpo primario para la subunidad α_{1C} de los LTCC (GeneTex, Irvine, CA) y su respectivo anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-conejo (IgG H+L) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), ambos a una dilución de 1:500. Todos los anticuerpos secundarios utilizados se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Para la visualización de los núcleos, todas las muestras se incubaron con una dilución de 1:500 de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Por último, las preparaciones se montaron con el medio para fluorescencia 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Las preparaciones se observaron en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM800 (Jena, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión de 63X y con el programa informático ZEN v2.3 (blue edition). Las imágenes se analizaron y procesaron para su presentación con el programa informático ZEN v2.3 (blue edition).

5.5 Patch-Clamp

$1 - 1.5 \times 10^6$ BMMCs/ mL se distribuyeron en una caja de 48 pozos, habitualmente 1 mL/ pozo, colocando un cubreobjeto recubierto con poli-L-lisina (10 μ g/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los experimentos se llevaron a cabo 18 h después de haber colocado las laminillas y 24 h posteriores a la sensibilización de las células. Se efectuaron cursos temporales de estimulación con 500 ng/mL de LPS serotipo 026:B6 a tiempos: 0, 2 y 4 h, previo cambio de medio de cultivo.

Las laminillas se transfirieron a la cámara de registro (volumen de 400 μ L) perfundida continuamente, a una razón de 1-2 mL/min, con una solución externa estándar que contenía (en mM): NaCl (140), KCl (2.8), MgCl₂ (2), HEPES (10), glucosa (5.6), CaCl₂ (10), pH = 7.4 (ajustado con HCl). Las BMMCs se visualizaron con un microscopio

Nikon FN-S2N (Nikon, Tokio), acoplado a una cámara infrarroja de contraste de interferencia, con un objetivo de inmersión 40X y se seleccionaron aquellas células que estuvieran aisladas y que tuvieran dimensiones similares. Las pipetas se elaboraron con vidrio de borosilicato (Sutter Instruments, Novato, CA) y tuvieron una resistencia de 3-4 M Ω cuando se llenaron con una solución interna estándar que contenía (en mM): metanosulfonato de cesio (145), NaCl (8), MgCl₂ (1), MgATP (0.5), NaGTP (0.3), EGTA (1) y HEPES (10), pH = 7.4 (ajustado con HCl).

Los registros se llevaron a cabo en la configuración de fijación de voltaje a temperatura ambiente, utilizando el amplificador Axoclamp 200B (Axon Instruments, Union City, CA). Las señales fueron filtradas a 5 KHz, digitalizadas a 10 KHz con la Digidata 1332^a (Axon Instruments, Union City, CA) y almacenadas con el programa informático pCLAMP v8.3 (Molecular Devices). Los registros se analizaron con el programa informático pCLAMP v10.7 (Molecular Devices).

El sello entre la membrana celular y la pipeta se realizó con la solución externa estándar, en la cual, además se determinaron: la capacitancia (C_m) y la constante de tiempo (τ). Para aislar la corriente de Ca²⁺, se ajustó la solución extracelular sustituyendo los 140 mM de NaCl por 120 mM de N-metil-D-glucamina (NMDG) y adicionando 20 mM de cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl). Para obtener las curvas I-V, se aplicaron rampas de voltaje de -100 mV a +60 mV con una duración de 250 ms, empleadas cada 10 s desde un potencial fijo de -20 mV.

La osmolaridad de todas las soluciones se ajustó a 300 ± 10 mOsm, utilizando el osmómetro de presión de vapor Vapro 5520 (Wescor, Logan, UT).

6. Resultados

6.1 La Nifedipina Inhibe la Secreción del TNF- α Estimulada por LPS en BMMCs

Debido a que evidencia reciente indica que la secreción del TNF- α inducida por LPS en BMMCs requiere de la movilización de Ca²⁺ (Madera-Salcedo, Cruz, & Gonzalez-Espinosa, 2013), nosotros hipotetizamos que uno de los elementos implicados en dicha movilización eran los LTCC. Así pues, decidimos analizar el efecto de la nifedipina, antagonista selectivo de los LTCC, sobre la secreción máxima de TNF- α estimulada por LPS en BMMCs. Como se muestra en la figura 6, observamos que el pretratamiento con nifedipina inhibe la liberación del TNF- α a las 4 h en BMMCs sensibilizadas y estimuladas con LPS (control 395.871 ± 46.704 vs nifedipina 163.284 ± 48.368). Este resultado nos sugiere que los LTCC regulan positivamente la secreción del TNF- α inducida por LPS.

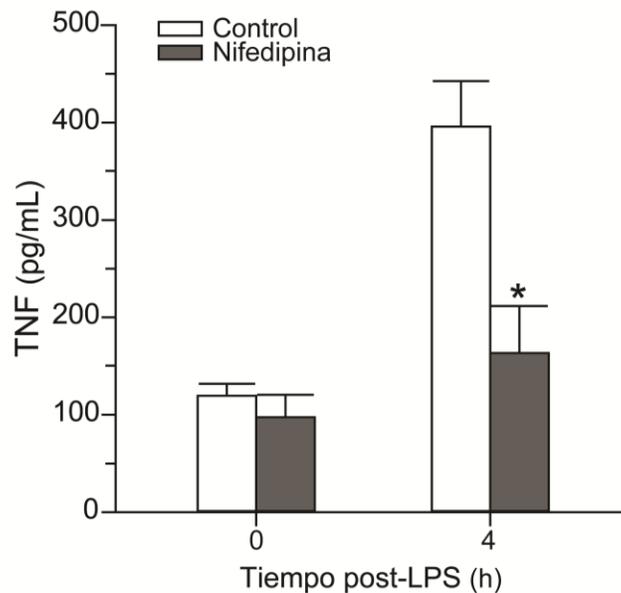


Figura 6. Efecto de la nifedipina sobre la secreción del TNF- α estimulada por LPS en BMMCs. Las MCs (2×10^6) fueron incubadas durante 15 min con nifedipina (10 μ M) o vehículo, antes de ser estimuladas con LPS (500 ng/mL). La concentración del TNF- α en los sobrenadantes se cuantificó mediante ELISA. Cada punto representa la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ANOVA de dos vías, Holm-Sidak.

6.2 El LPS Induce una Corriente Entrante de Ca^{2+} Mediada por LTCC en BMMCs

Tradicionalmente, los LTCC se asocian con las células excitables, ya que se activan por un cambio en el potencial de membrana o despolarización. Sin embargo, las células del sistema inmune no sufren una despolarización masiva de la membrana plasmática, lo cual ha llevado a cuestionar la funcionalidad de los LTCC en células no excitables. Para verificar que los LTCC regulan la entrada de Ca^{2+} extracelular en BMMCs, monitoreamos las corrientes iónicas después de la estimulación con LPS en experimentos de patch-clamp en célula completa, en su configuración de fijación de voltaje.

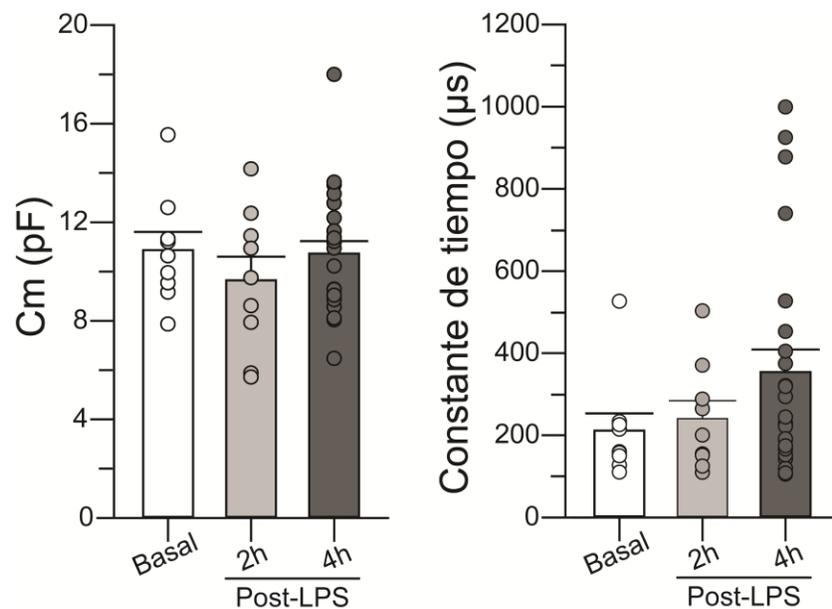


Figura 7. Propiedades pasivas de las BMMCs. Gráficos de barras (media \pm S.E.M. y los datos individuales) que resumen las propiedades pasivas de los grupos experimentales. C_m , capacitancia membranal de las BMMCs no estimuladas (0 h) ($n_{\text{células/cultivos}} = 11/6$), estimuladas por 2 h ($n_{\text{células/cultivos}} = 15/8$) y por 4 h ($n_{\text{células/cultivos}} = 25/7$).

Se registraron 51 BMMCs provenientes de cultivos independientes con características morfológicas similares, mantenidas en fijación de voltaje a -20 mV. Para el registro de las corrientes no se consideró el cambio en la resistencia de acceso. Una vez abierta la célula, se permitió que el sello se estabilizara durante 3-5 min. Posteriormente, se determinaron algunas propiedades pasivas de membrana manteniendo las células a un potencial de -20 mV. En la figura 7 se muestran los valores de las propiedades pasivas de las células registradas. En BMMCs no estimuladas (0 h), la capacitancia membranal (C_m)

fue de 10.858 ± 0.601 pF, con una constante de tiempo de 196.605 ± 35.352 μ s. El tratamiento con LPS durante 2 h y 4 h no modificó significativamente la C_m , ni la constante de tiempo.

La figura 8A muestra tres curvas I-V representativas obtenidas de BMMCs sensibilizadas y posteriormente estimuladas con LPS durante: 0, 2 y 4 h. El potencial de las BMMCs se fijó a -20 mV y se aplicaron rampas de voltaje de -100 mV a $+60$ mV, cada 10 s. La estimulación con LPS durante 2 y 4 h incrementó significativamente la amplitud de la corriente entrante en 6 de 17 células registradas a las 2 h y en 10 de 33 células registradas a las 4 h (amplitud de la corriente en pA, 0 h = -23.192 ± 2.253 ; 2 h = -47.526 ± 8.623 ; 4 h = -57.703 ± 5.551 ; Figura 8B).

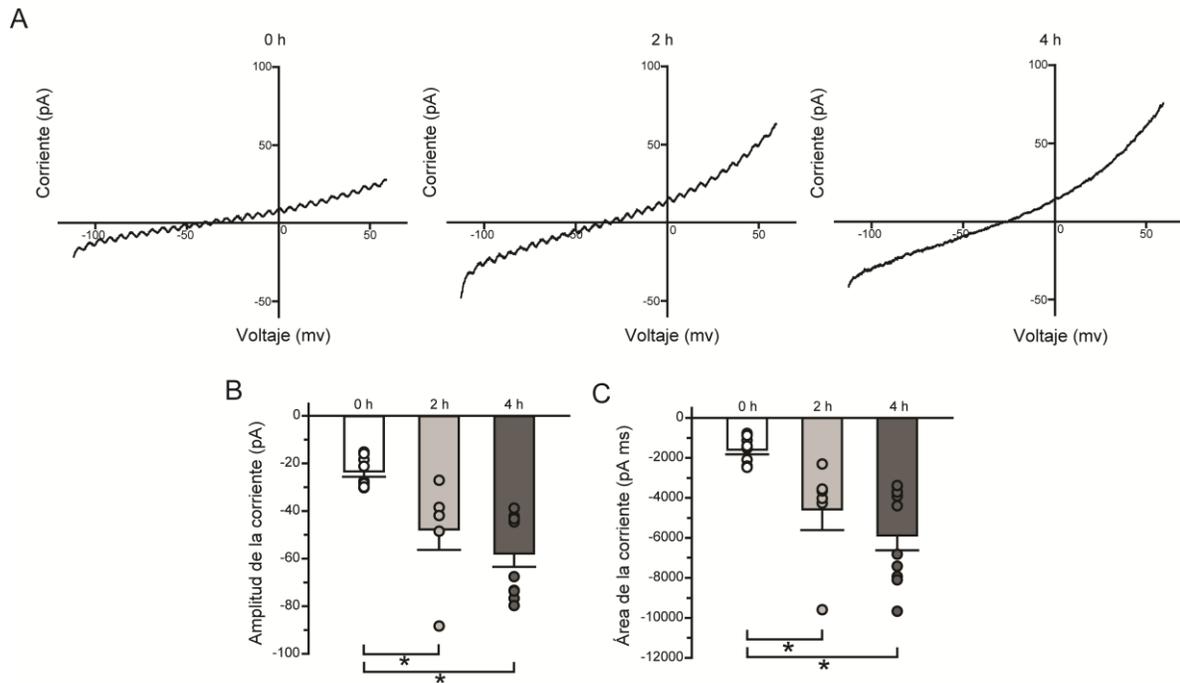


Figura 8. Inducción de una corriente entrante por la estimulación con LPS en BMMCs. (A) Curvas I-V representativas de BMMCs estimuladas con LPS (500 ng/mL) a tiempos de 0, 2 y 4 h. Se aplicaron rampas despolarizantes de -100 mV a $+60$ mV cada 10 s, desde un potencial fijo de -20 mV. (B y C) Gráficos de barras (media \pm S.E.M. y los datos individuales) que resumen la amplitud y el área de las corrientes entrantes registradas en BMMCs estimuladas con LPS a tiempos de 0 h ($n_{\text{células/cultivos}} = 8/5$), 2 h ($n_{\text{células/cultivos}} = 6/5$) y 4 h ($n_{\text{células/cultivos}} = 10/7$). * $p < 0.05$; (B) ANOVA de una vía, Holm-Sidak y (C) ANOVA de una vía en rangos, Dunn.

De manera consistente con esta observación, los grupos estimulados con LPS durante 2 y 4 h presentaron un incremento significativo en el área de la corriente entrante con respecto a las BMCCs no estimuladas (0 h) (área de la corriente en pA ms, 0 h = -1580.821 ± 236.303; 2 h = -4563.589 ± 1042.544; 4 h = -5871.687 ± 744.208; Figura 8C).

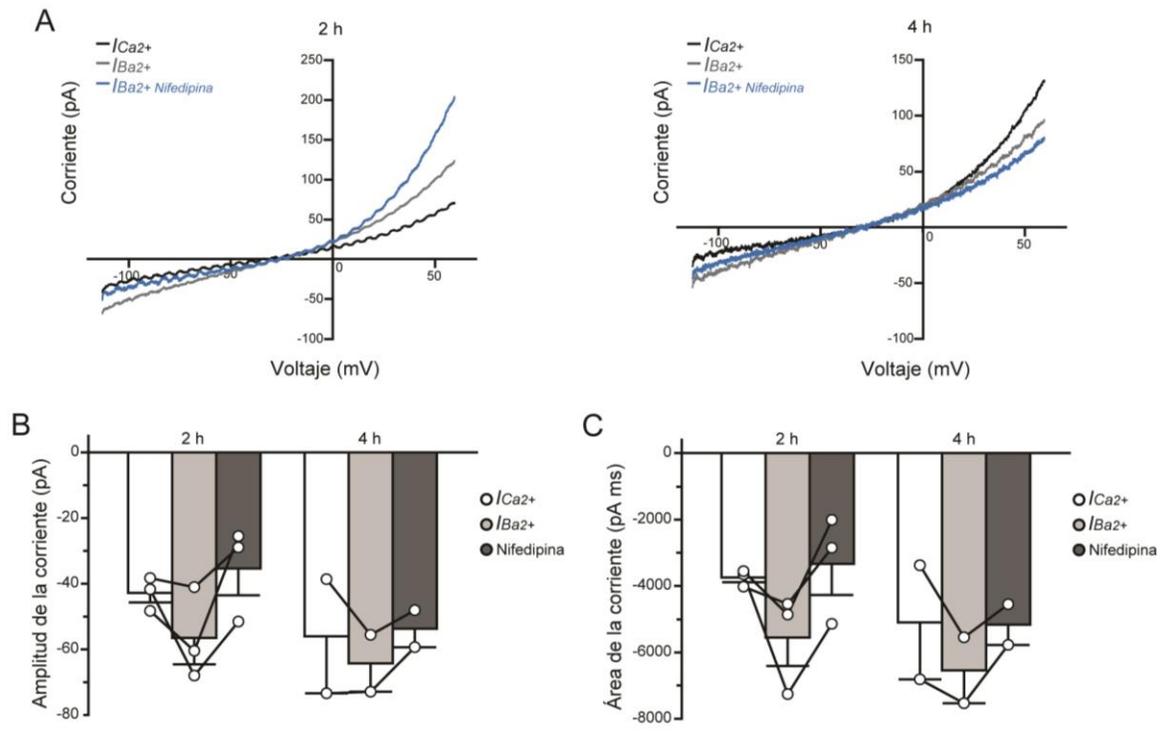


Figura 9. Selectividad iónica de la corriente entrante inducida por LPS en BMCCs. (A) Curvas I-V representativas de BMCCs estimuladas con LPS (500 ng/mL) durante 2 y 4 h (negro). Después de la inducción de la corriente en presencia de Ca^{2+} (10 mM) $I_{Ca^{2+}}$, el ion se sustituyó por Ba^{2+} (10 mM), resultando en un aumento en la amplitud de la corriente entrante, $I_{Ba^{2+}}$. Se aplicaron rampas despolarizantes de -100 mV a +60 mV cada 10 s, desde un potencial fijo de -20 mV. (B y C) Gráficos de barras (media ± S.E.M. y los datos individuales) que resumen la amplitud y el área de las corrientes $I_{Ca^{2+}}$ e $I_{Ba^{2+}}$ registradas en BMCCs estimuladas con LPS durante 2 h (n células/cultivos = 3/2) y 4 h (n células/cultivos = 2/2).

Para caracterizar el tipo de corriente entrante inducida por LPS en BMCCs, llevamos a cabo experimentos de sustitución iónica con Ba^{2+} (10 mM). El Ba^{2+} utilizado como ion sustituto del Ca^{2+} , provee una serie de beneficios para el análisis de los LTCC, ya que: 1) incrementa la amplitud de la corriente de Ca^{2+} , ya que tiene una mejor conductancia a través de los LTCC, 2) bloquea eficientemente canales de K^+ y 3) disminuye los procesos

de transducción secundarios, asociados al Ca^{2+} , v.g. la inactivación de los LTCC dependiente de Ca^{2+} .

Como se muestra en la figura 9A, la corriente entrante inducida por la estimulación con LPS durante 2 y 4 h fue llevada a cabo efectivamente por el Ba^{2+} . Sin embargo, el incremento en la amplitud de la corriente entrante de Ba^{2+} no fue significativo con respecto a la amplitud de la corriente entrante de Ca^{2+} para ambos grupos ($I_{\text{Ca}^{2+}}$ en pA, 2 h = -42.793 ± 2.933 vs $I_{\text{Ba}^{2+}}$ 2 h = -56.527 ± 8.031 ; $I_{\text{Ca}^{2+}}$ 4 h = -56.042 ± 17.393 vs $I_{\text{Ba}^{2+}}$ 4 h = -64.272 ± 8.667 ; Figura 9B). Consistente con esta observación, el incremento en el área de la corriente entrante de Ba^{2+} no fue significativo con respecto al área de la corriente entrante de Ca^{2+} (área $I_{\text{Ca}^{2+}}$ en pA ms, 2 h = -3743.494 ± 142.683 vs $I_{\text{Ba}^{2+}}$ 2 h = -5552.935 ± 856.453 ; $I_{\text{Ca}^{2+}}$ 4 h = -5096.129 ± 1717.769 vs $I_{\text{Ba}^{2+}}$ 4 h = -6540.564 ± 994.307 ; Figura 9C).

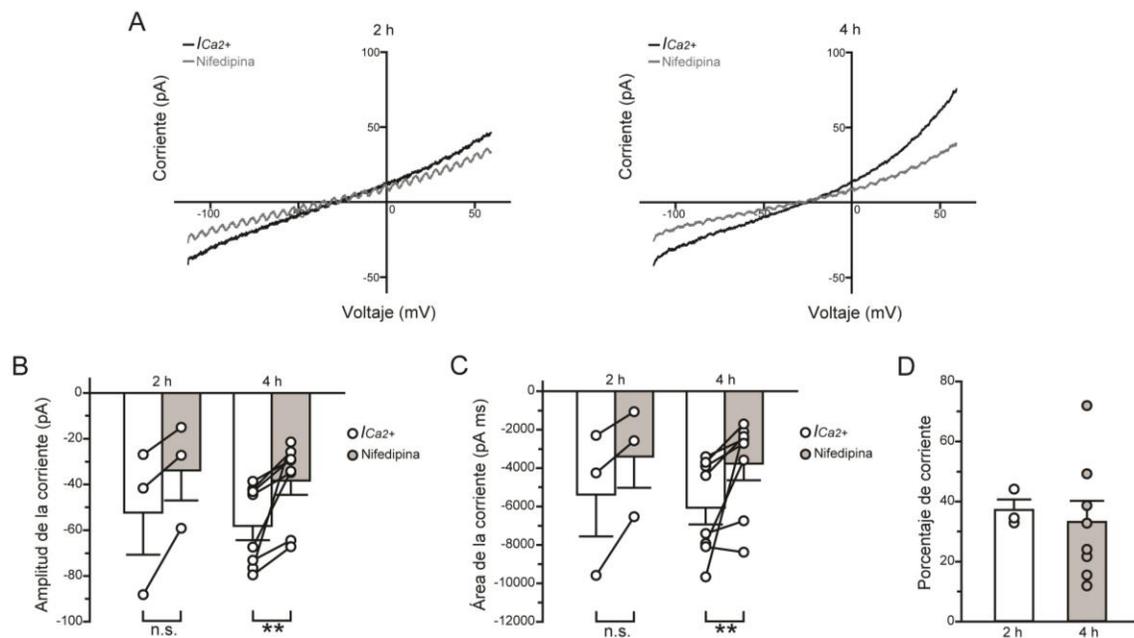


Figura 10. Inducción de una corriente tipo L por la estimulación con LPS en BMMCs. (A) Curvas I-V representativas de $I_{\text{Ca}^{2+}}$, LPS obtenidas en BMMCs estimuladas durante 2 y 4 h (negro). En color gris se muestra el bloqueo de la $I_{\text{Ca}^{2+}}$, LPS por el antagonista selectivo nifedipina (10 μM). (B y C) Gráficos de barras (media \pm S.E.M. y los datos individuales) que resumen la amplitud y el área de la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ en condición control (blanco) y tratada con el antagonista selectivo nifedipina (gris). (D) Se indica el porcentaje de la corriente sensible a nifedipina con respecto a su control. Número de células utilizadas, 2 h $n_{\text{células/cultivos}} = 3/3$ y 4 h $n_{\text{células/cultivos}} = 8/5$. ** $p < 0.01$; t -Student pareada en rangos.

Para determinar el tipo de corriente de Ca^{2+} inducida por LPS en BMMCs, llevamos a cabo experimentos utilizando el antagonista selectivo de los LTCC, nifedipina. La perfusión de nifedipina ($10 \mu\text{M}$) disminuyó significativamente la amplitud y el área de la corriente entrante con respecto al control, únicamente en el grupo de BMMCs estimuladas durante 4 h con LPS ($I_{\text{Ca}^{2+}}$ en pA, 4 h = -58.119 ± 6.212 vs $I_{\text{Ca}^{2+}}$ nifedipina 4 h = -38.301 ± 6.205 , figura 5B y; área $I_{\text{Ca}^{2+}}$ en pA ms, 4 h = -6065.577 ± 870.559 vs $I_{\text{Ca}^{2+}}$ nifedipina 4 h = -3765.907 ± 864.484 , Figura 10C). Sin embargo, no existió diferencia significativa en el porcentaje de corriente sensible a nifedipina inducido en BMMCs estimuladas durante 2 h y 4 h con LPS (2 h = 37.173 ± 3.498 ; 4 h = 33.201 ± 7.034). Estos resultados, en combinación con los datos obtenidos de la sustitución iónica, nos sugieren que la corriente inducida por LPS está mediada por LTCC.

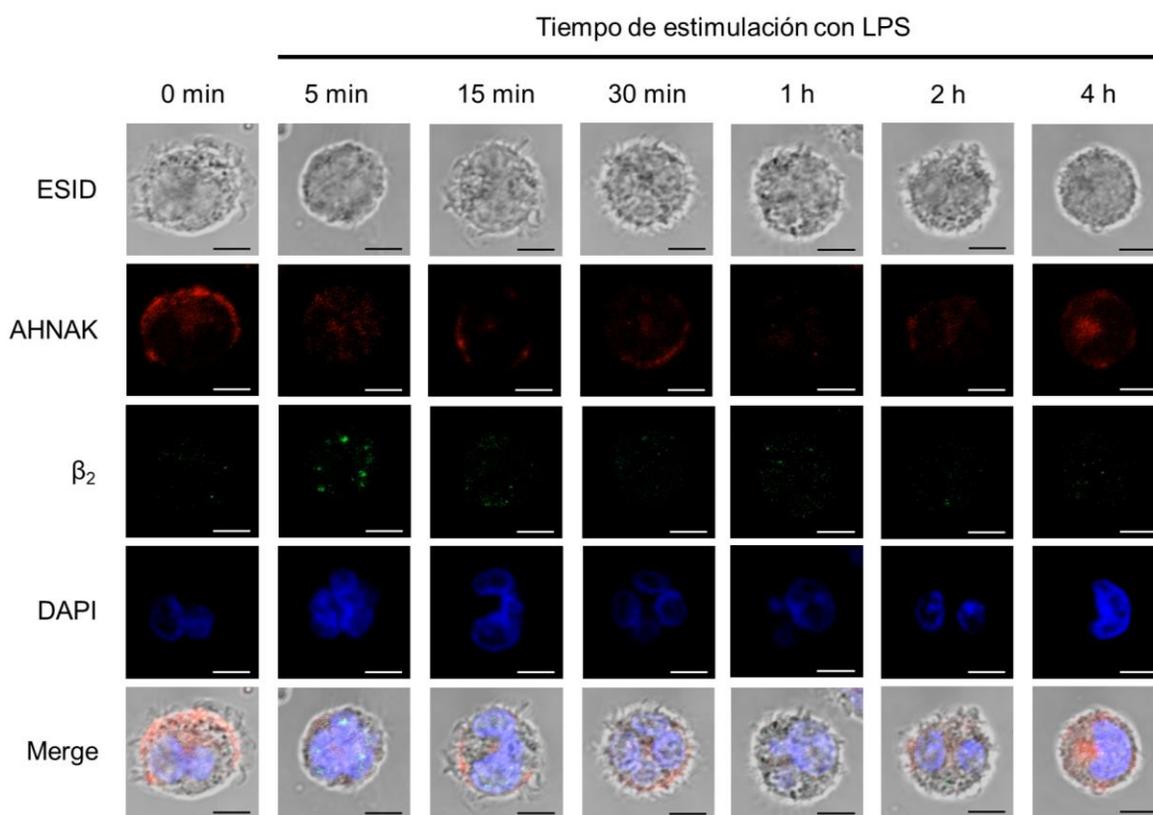


Figura 11. Localización celular de las proteínas AHNAK1 y de la subunidad β_2 en BMMCs. Las MCs (1×10^6) fueron estimuladas con LPS (500 ng/mL) a los tiempos indicados (0 – 4 h), posteriormente fueron fijadas y sometidas a microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos anti-AHNAK1 y anti-subunidad β_2 . Se muestran imágenes representativas de cortes ecuatoriales de al menos 5 células analizadas ($n = 1$). Barra de escala = $5 \mu\text{m}$.

6.3 El LPS no Induce Colocalización entre las Proteínas AHNAK1 y la Subunidad β_2 de los LTCC en BMMCs

Debido a que datos de experimentos realizados en linfocitos T han demostrado que AHNAK1 participa en la translocación membranal de la subunidad α_1 de los LTCC, mediante su interacción con la subunidad reguladora β_2 (Matza *et al.*, 2008), decidimos poner a prueba la hipótesis de que un mecanismo similar pudiera estar detrás de la aparición de la corriente de Ca^{2+} tipo L en BMMCs, después de un tratamiento de cuatro horas con LPS. Para ello, decidimos determinar la localización celular de estas proteínas en las BMMCs sensibilizadas y estimuladas con LPS.

Como se muestra en la figura 11, a cualquiera de los tiempos analizados (0 – 4 h), tanto AHNAK1 como la subunidad β_2 de los LTCC se localizaron en el citoplasma de las BMMCs, sin mostrar colocalización o polarización, aún en presencia del estímulo.

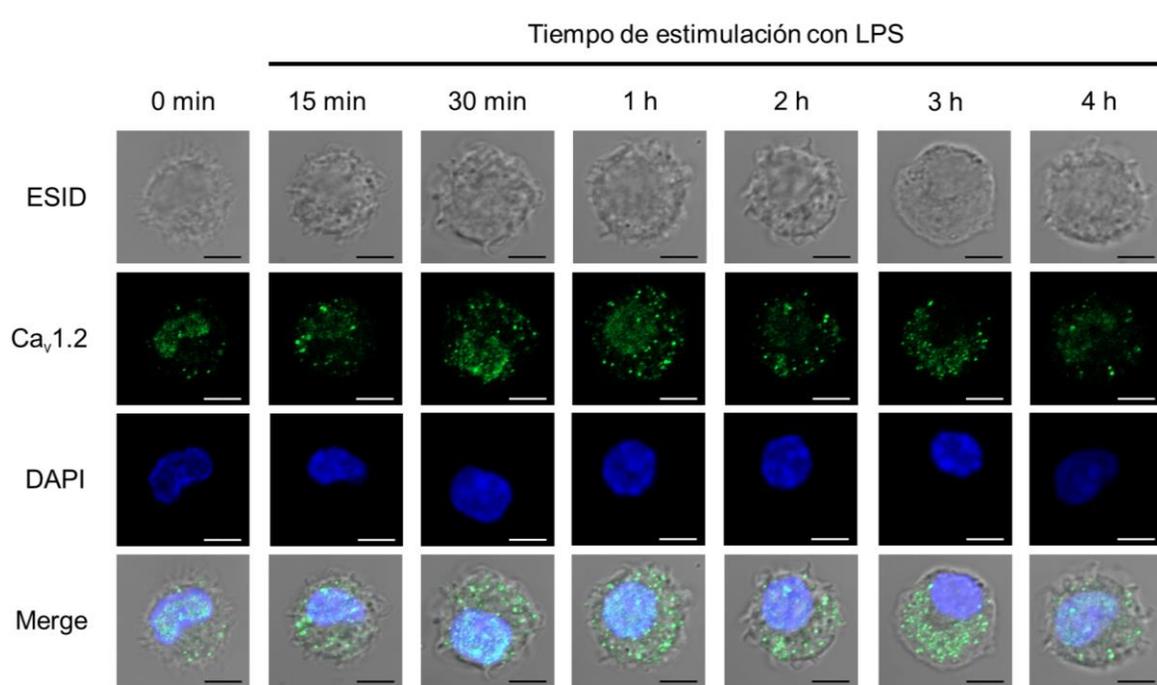


Figura 12. Localización celular de la subunidad α_{1C} en BMMCs. Las MCs (1×10^6) fueron estimuladas con LPS (500 ng/mL) a los tiempos indicados (0 – 4 h), posteriormente fueron fijadas y sometidas a microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos anti-subunidad α_{1C} . Se muestran imágenes representativas de cortes ecuatoriales de al menos 10 células analizadas ($n = 3$). Barra de escala = 5 μm .

6.4 El LPS no Modifica el Patrón de Distribución de la Subunidad α_{1C} de los LTCC en BMMCs

Para solventar el dilema anterior y dado que no contábamos con los anticuerpos dirigidos contra las subunidades β_1 , -3 y -4, que nos permitieran probar otras posibles interacciones con AHNAK1, decidimos evaluar la localización de la subunidad α_{1C} , la cual se expresa en la superficie de las MCs (Yoshimaru et al., 2009).

La microscopía de inmunofluorescencia confocal muestra que la subunidad α_{1C} se agrupa en paquetes discretos o vesiculados distribuidos en el citoplasma y en el núcleo de las células control (Figura 12). Dicha localización no se ve afectada por el tratamiento con LPS. Estos resultados nos sugieren que la translocación de la subunidad α_{1C} de los LTCC hacia la membrana plasmática no es el mecanismo involucrado en la modulación de la corriente mediada por los LTCC e inducida por LPS.

7. Discusión

El Ca^{2+} es un segundo mensajero versátil que regula una gran variedad de fenómenos celulares como la migración, la contracción, la exocitosis y la transmisión sináptica. En sentido más amplio, el Ca^{2+} define los límites de los procesos biológicos, esto es, la fertilización y la apoptosis. En sistemas especializados en secreción, como las MCs, se ha propuesto que el Ca^{2+} es un elemento esencial para su activación, sin embargo, los elementos implicados en su regulación están poco explorados. Recientemente se reportó que el BAPTA-AM [ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N, N, N', N'-tetra acético tetrakis (acetoximetil éster)], un quelante de Ca^{2+} , inhibe la liberación del TNF- α estimulada por LPS en BMMCs sensibilizadas con IgE, sugiriendo que dicho proceso requiere de la movilización de Ca^{2+} (Madera-Salcedo *et al.*, 2013). En este trabajo, investigamos la participación de dos elementos que conforman la red de señalización del Ca^{2+} , los LTCC y la proteína de andamiaje AHNAK1, para el control de la secreción en MCs. Nuestros principales hallazgos en BMMCs fueron: a) la nifedipina, antagonista selectivo de los LTCC, inhibió la secreción del TNF- α inducida por LPS; b) el LPS indujo la expresión de una corriente de Ca^{2+} sensible a nifedipina y; c) el LPS no modificó el patrón de distribución de la subunidad α_{1C} de los LTCC.

7.1 El Ca^{2+} en la Secreción del TNF- α

La secreción de citocinas, en general, y la liberación del TNF- α en MCs, en particular, ha sido estudiada principalmente en un contexto ligado a la activación del receptor Fc ϵ RI en diversas líneas celulares (Ishizuka *et al.*, 1997; Zhang, Baumgartner, Yamada, & Beaven, 1997; Csonga, Prieschl, Jaksche, Novotny, & Baumruker, 1998). En tales circunstancias, se ha demostrado que la secreción del TNF- α requiere de la entrada de Ca^{2+} , de la activación de la PKC y de la integridad del aparato de Golgi (Baumgartner, Yamada, Deramo, & Beaven, 1994b; Nakata & Hide, 1998; Pelletier *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2002). A partir de estas observaciones iniciales, se ha determinado que la secreción del TNF- α inducida por la activación del TLR-4 también requiere de la movilización de Ca^{2+} (Madera-Salcedo *et al.*, 2013), indicando, por tanto, que este ion no es un elemento accidental, sino que es un importante activador de la liberación del TNF- α , de manera independiente al estímulo.

No obstante, poco se conoce sobre los elementos implicados en la regulación de la entrada de Ca^{2+} en MCs. Hoy en día, está plenamente aceptado que la SOCE es el mecanismo principal – ¿único? – responsable de la entrada de Ca^{2+} en MCs, probablemente porque se asume que la estimulación antigénica a través del FcεRI y la depleción de Ca^{2+} inducida farmacológicamente son similares. Sin embargo, recientemente se reportó que la nifedipina (1 μM), antagonista selectivo de los LTCC – elemento ligado a la VOCE –, disminuye el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el complejo IgE/Ag en BMMCes (Suzuki *et al.*, 2008; Yoshimaru *et al.*, 2009). Además, mediante estudios funcionales se reportó que la nifedipina disminuye significativamente la producción del TNF- α e IL-13 e, incrementa la desgranulación anafiláctica (Yoshimaru *et al.*, 2009). Nuestros resultados muestran por primera vez, que la nifedipina (10 μM) es capaz de disminuir, hasta valores basales, la secreción del TNF- α inducida por la estimulación con LPS en BMMCes sensibilizadas con IgE (véase Figura 6). Estos resultados en conjunto sugieren que la secreción del TNF- α es regulada positivamente por receptores sensibles a DHP (DHPR) y, que no está plenamente asociado al estímulo en cuestión. Es decir, existen vías comunes de señalización implicadas con la liberación del TNF- α inducida por diversos estímulos en MCs.

Contrario a lo reportado por Yoshimaru, Suzuki, Inoue & Ra (2009), nuestros resultados muestran que la nifedipina inhibió la secreción del TNF- α , mientras que en su estudio dicho fármaco no inhibió por completo el fenómeno (80 % de inhibición con respecto al control). Esta diferencia en el efecto sobre la respuesta secretora se puede explicar a partir de la naturaleza del estímulo utilizado – IgE/Ag vs LPS – o la concentración del antagonista empleado – 1 vs 10 μM –. Un análisis más exhaustivo debería considerar el tipo de modelo celular utilizado. En nuestro estudio, se emplearon BMMCes murinas, cuyo TNF- α se encuentra almacenado en los gránulos secretores (TNF- α preformado), mientras que Yoshimaru, Suzuki, Inoue & Ra (2009) se valieron de una línea celular de MCs, RBL-2H3, que solamente es capaz de sintetizar TNF- α *de novo*.

En este mismo modelo celular, se ha reportado que la síntesis (o producción) del TNF- α se induce tanto por ionomicina, ionóforo de Ca^{2+} , como por forbol-miristato-acetato (PMA), activador de la PKC. Sin embargo, la liberación del TNF- α requiere de la activación concomitante de la PKC y de la estimulación con ionomicina (Baumgartner *et al.*, 1994b; Pelletier *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2002). Si bien en el presente trabajo no

analizamos el papel del Ca^{2+} a nivel transcripcional, transduccional o postransduccional del TNF- α , se sabe que la secreción tardía (4 – 6 h) del TNF- α inducida por LPS en BMMCs es sensible a actinomicina D, inhibidor de la transcripción, y brefeldina A, inhibidor del transporte de proteínas (Madera-Salcedo *et al.*, 2013), por lo que sería interesante evaluar si el Ca^{2+} movilizado a través de los DHPR modula diferencialmente cada uno de estos niveles de regulación del proceso de secreción del TNF- α .

7.2 Mecanismo de Activación de los LTCC en Células no Excitables

El debate central sobre la participación de los DHPR como canales de Ca^{2+} en MCs y, en general en células no excitables, se relaciona con el hecho de que estos canales se activan con una fuerte despolarización en células excitables, mientras que el potencial de membrana de las BMMCs sensibilizadas con IgE en este estudio, fue de alrededor de – 20 mV. Si bien, nosotros demostramos que la nifedipina, antagonista selectivo de los DHPR, inhibió la secreción de TNF- α inducida por la estimulación del TLR-4 en BMMCs, para algunos autores este tipo de efectos no está relacionado directamente con el papel de los Ca_v , sino con un efecto sobre los canales de K^+ (Randriamampita, Bismuth, Debré, & Trautmann, 1991). En tales condiciones, la inhibición de estos canales disminuiría la fuerza impulsora electroquímica, lo cual depende del potencial de equilibrio del Ca^{2+} .

Por tal motivo, nosotros decidimos verificar que los DHPR regulan la entrada de Ca^{2+} extracelular en BMMCs, monitoreando las corrientes iónicas después de la estimulación con LPS en experimentos de patch-clamp. Nuestros resultados muestran que la estimulación de las BMMCs con LPS durante 2 y 4 h indujo un incremento en la amplitud de la corriente entrante en 35 % (6/17) y 30 % (10/33) de las células analizadas a los tiempos correspondientes. Además, los experimentos de sustitución iónica con Ba^{2+} demostraron una selectividad para el Ca^{2+} . Aunado a ello, en promedio, el 40 % de la corriente entrante fue sensible a nifedipina (10 μM), sugiriendo que la estimulación con LPS en BMMCs induce la activación de DHPR o LTCC. En un aspecto más amplio, nuestros resultados sugieren que la sensibilidad al voltaje de los LTCC en MCs depende de la estimulación del receptor TLR-4, resultado que concuerda con la mayoría de los estudios realizados en células no excitables, en los que la simple despolarización química (incremento en la concentración extracelular de K^+) no fue suficiente para inducir la

activación de los LTCC y favorecer la entrada de Ca^{2+} (Stokes, Gordon, & Grafton, 2004; Yoshimaru et al., 2009). El incremento en la concentración extracelular de K^+ despolariza la membrana plasmática de las células excitables, porque previene que el K^+ intracelular salga, impidiendo la repolarización y favoreciendo la despolarización membranaral que activará a los LTCC. Tal mecanismo probablemente esté ausente en MCs, ya que no se ha reportado la expresión de K_v (Ashmole & Bradding, 2013; Feske *et al.*, 2015), aunado a ello se ha observado que el propio incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la estimulación del receptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ activa canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) (Duffy *et al.*, 2004).

Hasta la fecha, solamente dos publicaciones han aportado evidencias que sustenten la idea de que los Ca_v en células no excitables son sensibles a voltaje (Hijioka, Rosenberg, Lemasters, & Thurman, 1992; Omilusik *et al.*, 2011). En uno de ellos, se registraron corrientes con propiedades electrofisiológicas características de los $\text{Ca}_v1.4$ obtenidas en sistemas heterólogos (Omilusik *et al.*, 2011). Sin embargo, debemos reconocer que las células del sistema inmune no sufren una despolarización masiva de la membrana plasmática. Algunos autores relacionan la ausencia de sensibilidad o dependencia a voltaje con la estructura molecular de los Ca_v1 .

Los grupos de investigación de Richard Flavell, Wilfred Jefferies y Gillian Grafton han descrito formas truncadas de todos los LTCC ($\text{Ca}_v1.1$ -1.4) en linfocitos T, que se generan a través de un procesamiento por corte y empalme alternativo (Stokes, Gordon, & Grafton, 2004; Kotturi & Jefferies, 2005; Matza *et al.*, 2016). Algunas variantes carecen de uno de los cuatro sensores de voltaje descritos para la subunidad α_1 (Kotturi & Jefferies, 2005). Sin embargo, sólo recientemente se demostró que la variante para el $\text{Ca}_v1.1$, descrita por Matza y cols. (2016), es capaz de conducir Ca^{2+} . Datos obtenidos mediante análisis de Western Blot, sugieren que la subunidad α_{1C} expresada en BMMCs tiene una estructura similar al $\text{Ca}_v1.2$ expresado en cardiomiocitos de ratón (Ramírez-Moreno Itzel Guadalupe, datos no publicados), por lo que sería interesante secuenciar el RNA mensajero (mRNA) de la subunidad α_{1C} , para verificar si existen modificaciones menores que puedan afectar la sensibilidad a voltaje de los $\text{Ca}_v1.2$ presentes en BMMCs.

La inducción de la corriente sensible a nifedipina durante 2 y 4 h, sugiere que la liberación del $\text{TNF-}\alpha$ resultante de la estimulación del receptor TLR-4 en BMMCs es un proceso activo que requiere de la entrada constante de Ca^{2+} desde el espacio extracelular,

de manera similar a la secreción del TNF- α inducida por la estimulación del receptor Fc ϵ RI en células RBL-2H3 (Baumgartner *et al.*, 1994b; Pelletier *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2002). De hecho, el presente trabajo constituye el primer reporte sobre la inducción de una corriente entrante de Ca²⁺, tras la activación del receptor TLR-4 en BMMCs. Previamente, Madera-Salcedo y cols. (2013) no fueron capaces de detectar cambios en la [Ca²⁺]_i en respuesta a la estimulación con LPS en BMMCs, probablemente porque sus mediciones fueron realizadas en una población celular y no en MCs individuales. De un total de 50 células, el 32 % respondieron al LPS (500 ng/mL) con la inducción de una corriente sensible a nifedipina. Una proporción similar de respuesta al LPS (47 %) fue reportada en macrófagos, en la que además, se observó heterogeneidad en el incremento en la [Ca²⁺]_i (Letari, Nicosia, Chiavaroli, Vacher, & Schlegel, 1991).

7.3 Canales Iónicos Activados en BMMCs en Reposo y Estimuladas

Las MMCs en reposo expresan una corriente de K⁺ rectificadora entrante (Lindau & Fernandez, 1986; McCloskey & Qian, 1994), que establece un potencial de membrana en reposo de aproximadamente - 70 mV (Wischmeyer, Lentz, & Karschin, 1995). En contraste, el potencial de membrana en reposo de las BMMCs sensibilizadas en este estudio fue de alrededor de - 20 mV, similar al reportado para las CTMCs (Hill, Martin, & Miller, 1996). La diferencia entre los valores reportados puede ser un efecto directo del cesio (Cs⁺) presente en la solución intracelular o bien, ser una consecuencia de la sensibilización con IgE. En relación con el segundo argumento, se han identificado diversas corrientes iónicas inducidas por secretagogos en MCs, entre las que se incluyen conductancias catiónicas no selectivas de Ca²⁺ y Na⁺ (Fasolato, Hoth, Matthews, & Penner, 1993). En nuestro estudio, todas las BMMCs en reposo, esto es, células sensibilizadas con IgE, pero no estimuladas con LPS, mostraron corrientes rectificadoras salientes a potenciales positivos, con un potencial de inversión de aproximadamente - 20 mV. Si bien en el presente trabajo no analizamos la naturaleza de estas corrientes, la cinética de la curva *I-V* sugiere que la corriente es llevada a cabo predominantemente por cloro (Cl⁻). Asimismo, evidencias previas respaldan esta afirmación. Por ejemplo, en condiciones de reposo, una corriente similar se presenta en MCs peritoneales y BMMCs de rata (Hill *et al.*, 1996), así como en HMCs y RBL-2H3 mediante la estimulación con IgE (Matthews, Neher, & Penner, 1989;

Romanin, Reinsprecht, Pecht1, & Schindler, 1991; Duffy, Lawley, Conley, & Bradding, 2001). Un segundo tipo de corriente de Cl^- inducida por la estimulación con IgE, incluye corrientes de Cl^- dependientes de Ca^{2+} , identificadas en diversas HMCs (Duffy, Lawley, *et al.*, 2001; Duffy, Leyland, Conley, & Bradding, 2001).

En este mismo sentido, el tratamiento con LPS durante 2 y 4 h no sólo fue capaz de inducir un incremento en la corriente entrante, sino que, también moduló positivamente el componente saliente de las curvas *I-V*. Este hallazgo, en conjunto con la continuidad en la constante de tiempo (τ) de las BMMCs frente a la estimulación con LPS sugiere que, la activación del TLR-4 modula la expresión de canales, probablemente de Cl^- , que no determinan el potencial de membrana en reposo de las BMMCs. No obstante, es necesario destacar que la activación del TLR-4 en monocitos humanos induce la aparición de una corriente de potasio de rectificación entrante (I_{Kir}) (Kim *et al.*, 2015) y que la solución intracelular de registro utilizada en este trabajo contenía Cs^+ , por lo que es probable que nuestras condiciones experimentales estén infravalorando o desestimando modificaciones *reales* en algunas propiedades pasivas de las BMMCs.

A diferencia de lo reportado en diversas líneas celulares de macrófagos (McKinney & Gallin, 1990; Nelson, Jow, & Jow, 1992; Visentin, Agresti, Patrizio, & Levi, 1995), la estimulación con LPS no incrementó la C_m de las BMMCs. La discrepancia puede atribuirse a la función que desempeña cada tipo celular en la protección del organismo frente a un patógeno. Los macrófagos fagocitan a los agentes infecciosos y para ello es indispensable que dispongan de una superficie membranal suficiente. Por su parte, la activación de las MCs, mediante ligandos bacterianos, induce la liberación de citocinas, como el $\text{TNF-}\alpha$, en ausencia de la fusión gránulo-membrana plasmática. Por tanto, nuestros resultados apoyan la idea de que la secreción del $\text{TNF-}\alpha$ ocurre a través de la PMD.

7.4 El Receptor TLR-4 y su Acoplamiento a la Entrada de Ca^{2+}

Los mecanismos de transducción de señales del TLR-4 han sido ampliamente descritos en función de la síntesis de citocinas proinflamatorias y no en base al mecanismo de secreción, íntimamente ligado con el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Probablemente porque dichos estudios se han realizado en modelos celulares no especializados en secreción, a diferencia de las MCs. A partir de estos estudios, se ha determinado que la estimulación de diversos TLRs

induce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Letari, Nicosia, Chiavaroli, Vacher, & Schlegel, 1991; Seabra, Stachlewitz, & Thurman, 1998; Wheeler *et al.*, 2000; Martin, Pingle, Hallam, Rybak, & Ramkumar, 2006; Zhou, Yang, & Li, 2006; Ye *et al.*, 2012; Kenny *et al.*, 2013; Buyck *et al.*, 2013; Vogel *et al.*, 2015; Huang, Showalter, Xu, Czernliecki, & Koski, 2017; Su *et al.*, 2017; S. Tang *et al.*, 2017). De igual forma, se reportó que la secreción de TNF- α estimulada por la activación del TLR-4 en BMMCs, requiere de la movilización de Ca^{2+} (Madera-Salcedo *et al.*, 2013). Sin embargo, el mecanismo implicado en la regulación del Ca^{2+} está poco explorado.

A diferencia de nuestros resultados de electrofisiología, la mayoría de los estudios sugieren que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la activación del TLR-4 en macrófagos, está mediado por elementos que conforman la SOCE (PLC γ -IP $_3$ -STIM1) (Ye *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2017). Asimismo, evidencia reciente sugiere que la estimulación del TLR-4 puede activar vías independientes a la SOCE y VOCE, entre las que se ha implicado la activación de canales TRPM7 (*receptor de potencial transitorio de melastatina 7*) (Schappe *et al.*, 2018). Los receptores TRPM7 se expresan en MCs y median corrientes con curvas *I-V* no lineales, con un componente rectificador saliente (Wykes *et al.*, 2007). En principio, la estimulación del TLR-4 podría regular positivamente a los receptores TRPM7 presentes en nuestras BMMCs y estar contribuyendo a la secreción del TNF- α . No obstante, es poco probable que las corrientes registradas tras la estimulación con LPS presenten un componente mediado por los canales TRPM7, debido a que el magnesio (Mg^{2+}) y el ATP (trifosfato de adenosina) intracelular presentes en la pipeta son capaces de inhibir estos canales (Nadler *et al.*, 2001).

Por otra parte, recientemente se reportó en una línea celular de macrófagos, RAW264.7, que la estimulación del TLR-4 induce oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ parcialmente dependientes de los DHPR y cuya apertura se encuentra subordinada a la activación de la cinasa ERK (Su *et al.*, 2017). Resultados similares se han obtenido en MCs y linfocitos T, a través de la activación de dos receptores estructuralmente relacionados entre sí, el receptor Fc ϵ RI y el receptor de linfocitos T (TCR). Por ejemplo, en células RBL-2H3, la nifedipina disminuyó considerablemente el incremento inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la estimulación del receptor Fc ϵ RI, pero tuvo un efecto mínimo sobre el incremento sostenido de Ca^{2+} (Yoshimaru *et al.*, 2009). Omilusik y cols. (2011) compararon el efecto de la Tg

sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ *Cacnaf^{-/-} vs WT*. Notablemente, las subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+CD44^{lo}$, $CD8^+CD44^{lo}$ y $CD8^+CD44^{hi}$ mostraron una disminución en el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por Tg, concluyendo que los $Ca_v1.4$ podrían ser necesarios para regular la SOCE (Omilusik *et al.*, 2011). En este mismo sentido, se ha demostrado que STIM1 regula recíprocamente los canales que median la I_{CRAC} y los $Ca_v1.2$. La activación de STIM1, a través de la depleción del Ca^{2+} de las pozas intracelulares, inhibe a los $Ca_v1.2$ internalizándolos y, promueve la activación de los canales Orai en la membrana plasmática (Park, Shcheglovitov, & Dolmetsch, 2010; Wang *et al.*, 2010). La internalización de los $Ca_v1.2$ inducida por STIM1 se establece a través de la interacción de los segmentos CAD (dominio de activación CRAC) (Park *et al.*, 2010) o SOAR (región de activación STIM-Orai) (Wang *et al.*, 2010) de STIM1 y el carboxilo-terminal de los $Ca_v1.2$.

En suma, estos hallazgos sugieren una asociación funcional y física entre los elementos de la SOCE y la VOCE. Por tanto, con base en nuestros resultados nosotros hipotetizamos que la estimulación del receptor TLR-4 en BMMCs desencadenará un mecanismo similar a la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR), en la que el Ca^{2+} introducido por los Ca_v , activará a los receptores de rianodina (RyR) localizados en la membrana del ER promoviendo el vaciamiento de las pozas intracelulares y favoreciendo la activación de STIM1-Orai. El mecanismo propuesto es consistente con el hecho de que la nifedipina inhibió en su totalidad la secreción del TNF- α inducida por LPS en BMMCs, esto es, los Ca_v actúan corriente arriba de otros canales de Ca^{2+} .

7.5 Localización Subcelular de AHNAK1 y de las Proteínas Accesorias de los LTCC

La subunidad α_1 de los Ca_v1 y Ca_v2 muestra poca o nula localización en la membrana plasmática y, produce corrientes pequeñas o ninguna en células excitables, cuando la subunidad α_1 se expresa en ausencia de la subunidad β . En linfocitos T, evidencia sugiere que la proteína de andamiaje, AHNAK1, se requiere para la inserción membranal de la subunidad α_1 , probablemente a través de su interacción con la subunidad β_2 (Matza *et al.*, 2008). Por tal motivo, decidimos poner a prueba la hipótesis de que un mecanismo similar podría estar detrás de la aparición de la corriente de Ca^{2+} sensible a nifedipina en BMMCs.

Nuestro resultados muestran por primera vez, la distribución subcelular de la proteína AHNAK1 y la subunidad accesoria β_2 de los LTCC en BMMCs. Previamente, mediante estudios de coimmunoprecipitación, se determinó la participación de AHNAK1 en el sistema de transducción de señales del receptor TLR-4 (Martín-Ávila *et al.*, 2016). En ese estudio se estableció que, la activación del TLR-4 induce la disociación entre las isoformas clásicas fosforiladas de la proteína cinasa C (p-PKC α/β) y AHNAK1 (Martín-Ávila *et al.*, 2016). Nuestros resultados de microscopía de inmunofluorescencia confocal muestran que la proteína AHNAK1, en condiciones basales, se localizó a lo largo de la membrana plasmática con una distribución difusa en el citoplasma, concordando con el patrón previamente reportado en osteoblastos (Shao *et al.*, 2009). No obstante, no mostró colocalización con la subunidad β_2 , ni se modificó su patrón de distribución, en presencia del estímulo.

Además, nuestro estudio es el primero en mostrar la localización subcelular de la subunidad β_2 de los LTCC en BMMCs en particular y, en células del sistema inmune en general. La microscopía confocal muestra que dicha subunidad se agrupa en paquetes discretos o vesiculados distribuidos en todo el citoplasma, pero, con una expresión baja. Estos datos concuerdan con el estudio de Yamasaki y cols. (2012), en el que determinaron que las BMMCs expresan cantidades bajas del mRNA para las subunidades β_2 y β_4 .

Un primer análisis de estos resultados nos sugeriría que nuestra hipótesis no se comprueba, sin embargo, debemos resaltar que de acuerdo con lo reportado por Yamasaki y cols. (2012), las BMMCs expresan las subunidades β_2 y β_4 a nivel transcripcional, las cuales pudieran tener una función redundante sobre la expresión membranar de la subunidad α_1 a través de la proteína AHNAK1. Además, la entrada de Ca^{2+} inducida por la activación del TCR se encuentra disminuida en linfocitos T CD4^+ y CD8^+ , carentes de las subunidades β_3 y β_4 (Badou *et al.*, 2006; Jha *et al.*, 2009). Al mismo tiempo, no podemos descartar la participación de AHNAK1 en la activación o modulación de los Ca_v en BMMCs, ya que, estructuralmente contiene un dominio PDZ en su extremo aminoterminal, que es importante para la organización espacial de canales iónicos (Doyle *et al.*, 1996). Asimismo, AHNAK funciona como un inhibidor de los $\text{Ca}_v1.2$ en cardiomiocitos (Alvarez *et al.*, 2004; Haase *et al.*, 2005), modulando la inactivación dependiente de voltaje de estos canales (Alvarez *et al.*, 2010).

7.6 Distribución Subcelular de la Subunidad α_1 de los LTCC y su Mecanismo de Activación

La evaluación de todas las posibles interacciones que en principio puedan estar estableciéndose entre las subunidades α_1 y β de los LTCC en las BMMCs, resulta en términos prácticos, inviable. Además, si el mecanismo que estaba detrás de la aparición de la corriente tipo L en BMMCs involucraba la inserción del poro del canal en la membrana plasmática, nos resultó más factible analizar la distribución de la subunidad α_{1C} de los LTCC en BMMCs.

Nuestros resultados muestran por primera vez que, la subunidad α_{1C} de los LTCC se distribuye predominantemente en el citoplasma y núcleo y, en pocas ocasiones, a lo largo de la membrana plasmática. La estimulación con LPS, aún durante 4 horas, no modificó esta distribución basal de la subunidad α_{1C} . Esto podría, explicar por qué la expresión de la subunidad α_{1C} en la superficie celular, detectada por citometría de flujo, fue tan baja en BMMCs (Yoshimaru *et al.*, 2009). Nuestros resultados sugieren además que la expresión membranal de la subunidad α_{1C} no es el mecanismo que subyace a la aparición de la corriente tipo L en este modelo celular. Ante tal escenario, es necesario subrayar que dos estudios independientes han reportado que en BMMCs se expresa el mRNA que codifica para la subunidad α_{1D} de los LTCC (Yoshimaru *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2012). Asimismo, Yamasaki y cols. (2012) reportaron el patrón de distribución de la subunidad α_{1D} , que es muy similar a la localización de la subunidad α_{1C} reportada en este trabajo. Por tanto, se puede hipotetizar que la estimulación con LPS en BMMCs modulará diferencialmente la expresión en la superficie celular de la subunidad α_{1D} , pero no la de la subunidad α_{1C} de los LTCC y, que este mecanismo será el responsable de la modulación de la corriente tipo L. Sin embargo, no podemos descartar que un mecanismo alternativo a la translocación e inserción de la subunidad α_1 esté involucrado en la activación de los canales $Ca_v1.2$ en las BMMCs. Nosotros nos inclinamos por un mecanismo independiente del voltaje, que involucre una modificación química de los $Ca_v1.2$ y que además sea compatible con la CICR descrita en párrafos anteriores. En células de músculo liso arterial, la $PKC\alpha$ agrupa a los LTCC para que operen en un modo de alta probabilidad de apertura, generando sitios de entrada de Ca^{2+} persistentes, denominados *chispitas* (*sparklets*, en inglés) de Ca^{2+} (Navedo, Amberg, Votaw, & Santana, 2005). Este modo de apertura de alta

probabilidad del canal, opera de manera independiente de los cambios en el potencial de membrana, e incluso del potencial de membrana en reposo (Amberg, Navedo, Nieves-Cintrón, Molkentin, & Santana, 2007; Navedo *et al.*, 2005). El modelo es compatible con nuestros datos de electrofisiología, en los que la inducción de la corriente fue dependiente de la activación del TLR-4. Asimismo, se ha reportado que las isoformas clásicas de la PKC regulan positivamente la secreción del TNF- α estimulada por LPS en BMMCs (Martín-Ávila *et al.*, 2016), por lo que sería interesante evaluar si un mecanismo de activación de los Ca_v1.2 dependiente de la PKC está presente en BMMCs.

Por otra parte, la subunidad α_1 de los LTCC citoplasmática puede tener una función específica y no solamente actuar como un reservorio para el recambio de nuevos canales en la superficie celular. Yamasaki y cols. (2012) reportaron que tras la activación del receptor Fc ϵ RI, la subunidad α_{1D} de los LTCC indujo la liberación de zinc (Zn) desde el ER (Yamasaki *et al.*, 2012). Esta ola de Zn potencia la capacidad de unión del NF κ B al DNA, controlando positivamente la síntesis de citocinas. Recientemente, este equipo de investigación reportó que tras la activación del receptor TLR-4, se induce la liberación de Zn desde el ER a través de los LTCC, regulando la expresión genética de citocinas proinflamatorias como la IL-6 (Uchida, Xiang, Arai, Kitamura, & Nishida, 2018). En suma, estos hallazgos obligan a replantearnos experimentos clave, entre ellos la cuantificación de la secreción de citocinas en presencia de BAPTA-AM⁸ o nifedipina, que nos permitan eliminar o discernir la contribución exclusiva del Zn al proceso de secreción.

⁸ La constante de disociación (K_d) del complejo Zn²⁺/BAPTA ($K_d = 7.9$ nM) (Benters *et al.*, 1997) es menor que la del complejo Ca²⁺/BAPTA ($K_d = 110$ nM) (Tsien, 1980).

8. Conclusiones

1. La activación del TLR-4 induce la aparición de una corriente mediada por LTCC que contribuye a la entrada de Ca^{2+} extracelular necesaria para la secreción del TNF- α estimulada por LPS en BMMCs.
2. A partir de los datos obtenidos no es posible concluir que la proteína AHNAK1 participe en la expresión membranal de la subunidad β de los LTCC en BMMCs.

9. Perspectivas

1. Determinar el mecanismo de activación de los LTCC.
2. Identificar el(los) componente(s) de la corriente rectificadora saliente inducida por LPS.
3. Explorar la(s) posible(s) función(es) de la subunidad α_1 de los LTCC que pudiera estar ejerciendo desde compartimientos intracelulares.

10. Bibliografía

- Abraham, S. N., & St. John, A. L. (2010). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews Immunology*, *10*(6), 440–452. <https://doi.org/10.1038/nri2782>
- Abrink, M., Grujic, M., & Pejler, G. (2004). Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 40897–40905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405856200>
- Agier, J., Pastwińska, J., & Brzezińska-Błaszczyk, E. (2018). An overview of mast cell pattern recognition receptors. *Inflammation Research*, *67*(9), 737–746. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1164-5>
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, *404*(6774), 193–197. <https://doi.org/10.1038/35004599>
- Aldenborg, F., & Enerbäck, L. (1988). Histochemical heterogeneity of dermal mast cells in athymic and normal rats. *The Histochemical Journal*, *20*(1), 19–28. <https://doi.org/10.1007/BF01745965>
- Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., ... Zamponi, G. W. (2011). The Cav β subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nature Neuroscience*, *14*(2), 173–180. <https://doi.org/10.1038/nn.2712>
- Alvarez, J., Hamplova, J., Hohaus, A., Morano, I., Haase, H., & Vassort, G. (2004). Calcium current in rat cardiomyocytes is modulated by the carboxyl-terminal ahnak domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 12456–12461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312177200>
- Alvarez, J. L., Petzhold, D., Pankonien, I., Behlke, J., Kouno, M., Vassort, G., ... Haase, H. (2010). Ahnak1 modulates L-type Ca $^{2+}$ channel inactivation of rodent cardiomyocytes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *460*(4), 719–730. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0853-x>
- Alvarez, J., Montero, M., & Garcia-Sancho, J. (1994). Agonist-induced Ca $^{2+}$ influx in human neutrophils is not mediated by production of inositol polyphosphates but by emptying of the intracellular Ca $^{2+}$ stores. *Biochemical Society Transactions*, *22*(3), 809–813. <https://doi.org/10.1042/bst0220809>

- Amberg, G. C., Navedo, M. F., Nieves-Cintrón, M., Molkentin, J. D., & Santana, L. F. (2007). Calcium sparklets regulate local and global calcium in murine arterial smooth muscle. *The Journal of Physiology*, *579*(1), 187–201. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124420>
- Andersson, C. K., Mori, M., Bjermer, L., Löfdahl, C. G., & Erjefält, J. S. (2009). Novel site-specific mast cell subpopulations in the human lung. *Thorax*, *64*(4), 297–305. <https://doi.org/10.1136/thx.2008.101683>
- Andrade, M. V., Iwaki, S., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., Cunha-Melo, J. R., & Beaven, M. A. (2011). Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *European Journal of Immunology*, *41*(3), 760–772. <https://doi.org/10.1002/eji.201040718>
- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M. F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., ... Akashi, K. (2005). Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(50), 18105–18110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509148102>
- Ashmole, I., & Bradding, P. (2013). Ion channels regulating mast cell biology. *Clinical & Experimental Allergy*, *43*(5), 491–502. <https://doi.org/10.1111/cea.12043>
- Badou, A., Jha, M. K., Matza, D., Mehal, W. Z., Freichel, M., Flockerzi, V., & Flavell, R. A. (2006). Critical role for the beta regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(42), 15529–15534. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607262103>
- Baumgartner, R. A., Yamada, K., Deramo, V. A., & Beaven, M. A. (1994a). Secretion of TNF from a rat mast cell line is a brefeldin A-sensitive and a calcium/protein kinase C-regulated process. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *153*(6), 2609–2617. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8077671>
- Baumgartner, R. A., Yamada, K., Deramo, V. A., & Beaven, M. A. (1994b). Secretion of TNF from a rat mast cell line is a brefeldin A-sensitive and a calcium/protein kinase C-regulated process. *The Journal of Immunology*, *153*(6), 2609–17. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/153/6/2609.long>
- Beaven, M. A., Rogers, J., Moore, J. P., Hesketh, T. R., Smith, G. A., & Metcalfe, J. C.

- (1984). The mechanism of the calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(11), 7129–7136. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/259/11/7129.long>
- Benditt, E. P., & Arase, M. (1959). An enzyme in mast cells with properties like chymotrypsin. *The Journal of Experimental Medicine*, 110(3), 451–460. <https://doi.org/10.1084/jem.110.3.451>
- Benters, J., Flögel, U., Schäfer, T., Leibfritz, D., Hechtenberg, S., & Beyersmann, D. (1997). Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using ¹⁹F-NMR spectroscopy. *The Biochemical Journal*, 322(Pt 3), 793–799. <https://doi.org/10.1042/bj3220793>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Bhattacharyya, R. P., Reményi, A., Yeh, B. J., & Lim, W. A. (2006). Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 655–680. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142710>
- Bienenstock, J. (1988). An update on mast cell heterogeneity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 81(5), 763–769. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(88\)90929-3](https://doi.org/10.1016/0091-6749(88)90929-3)
- Birnbaumer, L., Campbell, K. P., Catterall, W. A., Harpold, M. M., Hofmann, F., Horne, W. A., ... Tsien, R. W. (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 13(3), 505–506. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90021-3)
- Birnbaumer, L., Qin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J., & Stefani, E. (1998). Structures and functions of calcium channel β subunits. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 30(4), 357–375. <https://doi.org/10.1023/A:1021989622656>
- Birx, D. L., Berger, M., & Fleisher, T. A. (1984). The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents. *The Journal of Immunology*, 133(6), 2904–2909. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/133/6/2904.long>
- Blasius, A. L., & Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3), 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.012>

- Boesiger, J., Tsai, M., Maurer, M., Yamaguchi, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., ... Galli, S. J. (1998). Mast cells can secrete vascular permeability factor/ vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *The Journal of Experimental Medicine*, *188*(6), 1135–1145. <https://doi.org/10.1084/jem.188.6.1135>
- Bourinet, E., Soong, T. W., Sutton, K., Slaymaker, S., Mathews, E., Monteil, A., ... Snutch, T. P. (1999). Splicing of $\alpha 1A$ subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nature Neuroscience*, *2*(5), 407–415. <https://doi.org/10.1038/8070>
- Bradding, P., Feather, I. H., Howarth, P. H., Mueller, R., Roberts, J. A., Britten, K., ... Heusser, C. H. (1992). Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *176*(5), 1381–1386. <https://doi.org/10.1084/jem.176.5.1381>
- Buyck, J. M., Verriere, V., Benmahdi, R., Higgins, G., Guery, B., Matran, R., ... Urbach, V. (2013). *P. aeruginosa* LPS stimulates calcium signaling and chloride secretion via CFTR in human bronchial epithelial cells. *Journal of Cystic Fibrosis*, *12*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.06.007>
- Cardamone, C., Parente, R., Feo, G. De, & Triggiani, M. (2016). Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunology Letters*, *178*, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.07.003>
- Carlos, D., Frantz, F. G., Souza-Júnior, D. A., Jamur, M. C., Oliver, C., Ramos, S. G., ... Faccioli, L. H. (2009). TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes and Infection*, *11*(8–9), 770–778. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.025>
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, *57*(4), 411–425. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.5>
- Chang, W. C., Di Capite, J., Nelson, C., & Parekh, A. B. (2007). All-or-none activation of CRAC channels by agonist elicits graded responses in populations of mast cells. *The Journal of Immunology*, *179*(8), 5255–5263.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5255>

- Chang, W. C., Nelson, C., & Parekh, A. B. (2006). Ca²⁺ influx through CRAC channels activates cytosolic phospholipase A₂, leukotriene C₄ secretion, and expression of c-fos through ERK-dependent and -independent pathways in mast cells. *The FASEB Journal*, 20(13), 2381–2383. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6016fje>
- Chen, C. C., Grimbaldston, M. A., Tsai, M., Weissman, I. L., & Galli, S. J. (2005). Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), 11408–11413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504197102>
- Chen, Y., Li, M., Zhang, Y., He, L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., ... Yang, J. (2004). Structural basis of the α 1- β subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Nature*, 429(6992), 675–680. <https://doi.org/10.1038/nature02641>
- Church, M. K., Pao, G. J., & Holgate, S. T. (1982). Characterization of histamine secretion from mechanically dispersed human lung mast cells: effects of anti-IgE, calcium ionophore A23187, compound 48/80, and basic polypeptides. *The Journal of Immunology*, 129(5), 2116–2121. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/129/5/2116>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Cohen, R., Torres, A., Ma, H. T., Holowka, D., & Baird, B. (2009). Ca²⁺ waves initiate antigen-stimulated Ca²⁺ responses in mast cells. *The Journal of Immunology*, 183(10), 6478–6488. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901615>
- Conley, E. C., Brammar, W. J., & Brammar, W. J. (1999). VLG Ca: Voltage-gated calcium channels. *Ion Channel Factsbook*, 22–153. <https://doi.org/10.1016/B978-012184453-0/50005-6>
- Crivellato, E., Nico, B., Gallo, V. P., & Ribatti, D. (2010). Cell secretion mediated by granule-associated vesicle transport: a glimpse at evolution. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 293(7), 1115–1124. <https://doi.org/10.1002/ar.21146>
- Crivellato, E., Nico, B., Mallardi, F., Beltrami, C. A., & Ribatti, D. (2003). Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *The Anatomical Record*, 274A(1),

778–784. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10095>

- Csonga, R., Prieschl, E. E., Jaksche, D., Novotny, V., & Baumruker, T. (1998). Common and distinct signaling pathways mediate the induction of TNF- α and IL-5 in IgE plus antigen-stimulated mast cells. *The Journal of Immunology*, *160*(1), 273–283. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/160/1/273.long>
- Davenport, B., Li, Y., Heizer, J. W., Schmitz, C., & Perraud, A. L. (2015). Signature channels of excitability no more: L-type channels in immune cells. *Frontiers in Immunology*, *6*, 375. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00375>
- De Waard, M., Pragnell, M., & Campbell, K. P. (1994). Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron*, *13*(2), 495–503. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90363-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90363-8)
- De Waard, M., Witcher, D. R., Pragnell, M., Liu, H., & Campbell, K. P. (1995). Properties of the alpha 1-beta anchoring site in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(20), 12056–12064. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.20.12056>
- Dolphin, A. C. (2012). Calcium channel auxiliary $\alpha 2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(8), 542–555. <https://doi.org/10.1038/nrn3311>
- Douglas, W. W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *British Journal of Pharmacology*, *34*(3), 451–474. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb08474.x>
- Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., & MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell*, *85*(7), 1067–1076. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81307-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81307-0)
- Duffy, S. M., Berger, P., Cruse, G., Yang, W., Bolton, S. J., & Bradding, P. (2004). The K⁺ channel iKCA1 potentiates Ca²⁺ influx and degranulation in human lung mast cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *114*(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.04.005>
- 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>

- Duffy, S. M., Leyland, M. L., Conley, E. C., & Bradding, P. (2001). Voltage-dependent and calcium-activated ion channels in the human mast cell line HMC-1. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(2), 233–240. <https://doi.org/10.1189/jlb.70.2.233>
- Dupuis, G., Aoudjit, F., Ricard, I., & Payet, M. D. (1993). Effects of modulators of cytosolic Ca²⁺ on phytohemagglutinin-dependent Ca²⁺ response and interleukin-2 production in Jurkat cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 53(1), 66–72. <https://doi.org/10.1002/jlb.53.1.66>
- Dvorak, A. M., Massey, W., Warner, J., Kissell, S., Kagey-Sobotka, A., & Lichtenstein, L. M. (1991). IgE-mediated anaphylactic degranulation of isolated human skin mast cells. *Blood*, 77(3), 569–578. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/77/3/569.long>
- Dvorak, A. M., McLeod, R. S., Onderdonk, A., Monahan-Earley, R. A., Cullen, J. B., Antonioli, D. A., ... Cohen, Z. (1992). Ultrastructural evidence for piecemeal and anaphylactic degranulation of human gut mucosal mast cells in vivo. *International Archives of Allergy and Immunology*, 99(1), 74–83. <https://doi.org/10.1159/000236338>
- Echtenacher, B., Männel, D. N., & Hültner, L. (1996). Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*, 381(6577), 75–77. <https://doi.org/10.1038/381075a0>
- Ellinor, P. T., Yang, J., Sather, W. A., Zhang, J. F., & Tsien, R. W. (1995). Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron*, 15(5), 1121–1132. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90100-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90100-0)
- Enerbäck, L. (1987). Mucosal mast cells in the rat and in man. *International Archives of Allergy and Immunology*, 82(3–4), 249–255. <https://doi.org/10.1159/000234199>
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., ... Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3), 533–535. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81057-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81057-0)
- Fang, K., & Colecraft, H. M. (2011). Mechanism of auxiliary β -subunit-mediated membrane targeting of L-type (CaV1.2) channels. *The Journal of Physiology*, 589(18), 4437–4455. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.214247>

- 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>
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., ... Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>
- Feske, S., Wulff, H., & Skolnik, E. Y. (2015). Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*, 33, 291–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112212>
- Foreman, J. C., Hallett, M. B., & Mongar, J. L. (1977a). Movement of strontium ions into mast cells and its relationship to the secretory response. *The Journal of Physiology*, 271(1), 233–251. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1977.sp011998>
- Foreman, J. C., Hallett, M. B., & Mongar, J. L. (1977b). The relationship between histamine secretion and 45calcium-uptake by mast cells. *The Journal of Physiology*, 271(1), 193–214. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1977.sp011996>
- Foreman, J. C., & Mongar, J. L. (1973). The action of lanthanum and manganese on anaphylactic histamine secretion. *British Journal of Pharmacology*, 48(3), 527–537. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1973.tb08359.x>
- Foreman, J. C., Mongar, J. L., & Gomperts, B. D. (1973). Calcium ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process. *Nature*, 245(5423), 249–251. <https://doi.org/10.1038/245249a0>
- Franco, C. B., Chen, C. C., Drukker, M., Weissman, I. L., & Galli, S. J. (2010). Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level. *Cell Stem Cell*, 6(4), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.013>
- Freeman, J. G., Ryan, J. J., Shelburne, C. P., Bailey, D. P., Bouton, L. A., Narasimhachari, N., ... Stewart, J. K. (2001). Catecholamines in murine bone marrow derived mast cells. *Journal of Neuroimmunology*, 119(2), 231–238. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00384-8](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00384-8)
- 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>
- Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldeston, 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(1), 749–786. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141025>
- Galli, S. J., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 18(5), 693–704. <https://doi.org/10.1038/nm.2755>
- Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M., & Bryant, C. E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews Immunology*, 14(8), 546–558. <https://doi.org/10.1038/nri3713>
- Gelfand, E. W., Cheung, R. K., Grinstein, S., & Mills, G. B. (1986). Characterization of the role for calcium influx in mitogen-induced triggering of human T cells. Identification of calcium-dependent and calcium-independent signals. *European Journal of Immunology*, 16(8), 907–912. <https://doi.org/10.1002/eji.1830160806>
- Gentek, R., Ghigo, C., Hoeffel, G., Bulle, M. J., Msallam, R., Gautier, G., ... 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>
- Gioannini, T. L., Teghanemt, A., Zhang, D., Coussens, N. P., Dockstader, W., Ramaswamy, S., & Weiss, J. P. (2004). Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), 4186–4191. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306906101>
- Glennner, G. G., & Cohen, L. A. (1960). Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells. *Nature*, 185, 846–847. <https://doi.org/10.1038/185846a0>
- Gordon, J. R., & Galli, S. J. (1990). Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature*, 346(6281), 274–276. <https://doi.org/10.1038/346274a0>
- Grützkau, A., Krüger-Krasagakes, S., Baumeister, H., Schwarz, C., Kögel, H., Welker, P., ... Möller, A. (1998). Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth

- factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Molecular Biology of the Cell*, 9(4), 875–884. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.4.875>
- Haas, R., Heinrich, P. C., & Sasse, D. (1979). Proteolytic enzymes of rat liver mitochondria. Evidence for a mast cell origin. *FEBS Letters*, 103(1), 168–171. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81274-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81274-0)
- Haase, H., Alvarez, J., Petzhold, D., Doller, A., Behlke, J., Erdmann, J., ... Morano, I. (2005). Ahnak is critical for cardiac Ca(v)1.2 calcium channel function and its β -adrenergic regulation. *The FASEB Journal*, 19(14), 1969–1977. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3997com>
- Hagiwara, S., Ozawa, S., & Sand, O. (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *The Journal of General Physiology*, 65(5), 617–644. <https://doi.org/10.1085/jgp.65.5.617>
- Hanlon, M. R., Berrow, N. S., Dolphin, A. C., & Wallace, B. A. (1999). Modelling of a voltage-dependent Ca²⁺ channel β subunit as a basis for understanding its functional properties. *FEBS Letters*, 445(2–3), 366–370. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00156-8)
- Hatanaka, K., Kitamura, Y., & Nishimune, Y. (1979). Local development of mast cells from bone marrow-derived precursors in the skin of mice. *Blood*, 53(1). Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/53/1/142.long>
- Hide, M., & Beaven, M. A. (1991). Calcium influx in a rat mast cell (RBL-2H3) line. Use of multivalent metal ions to define its characteristics and role in exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(23), 15221–15229. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/266/23/15221.long>
- Hijioka, T., Rosenberg, R. L., Lemasters, J. J., & Thurman, R. G. (1992). Kupffer cells contain voltage-dependent calcium channels. *Molecular Pharmacology*, 41(3), 435–440. Retrieved from <http://molpharm.aspetjournals.org/content/41/3/435.long>
- 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. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 432(6), 986–994. <https://doi.org/10.1007/s004240050226>

- Hockerman, G. H., Peterson, B. Z., Johnson, B. D., & Catterall, W. A. (1997). Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37(1), 361–396. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.361>
- Hofmann, F., Lacinová, L., & Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 139* (pp. 33–87). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BFb0033648>
- 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>
- Huang, E., Showalter, L., Xu, S., Czernliecki, B. J., & Koski, G. K. (2017). Calcium mobilizing treatment acts as a co-signal for TLR-mediated induction of Interleukin-12 (IL-12p70) secretion by murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cellular Immunology*, 314, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.01.010>
- Irani, A. A., Schechter, N. M., Craig, S. S., DeBlois, G., & Schwartz, L. B. (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), 4464–4468. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4464>
- Ishizuka, T., Terada, N., Gerwins, P., Hamelmann, E., Oshiba, A., Fanger, G. R., ... Gelfand, E. W. (1997). Mast cell tumor necrosis factor alpha production is regulated by MEK kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6358–6363. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6358>
- Janeway, C. A. J. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54, 1–13. <https://doi.org/10.1101/SQB.1989.054.01.003>
- Jeong, H. J., Hong, S. H., Lee, D. J., Park, J. H., Kim, K. S., & Kim, H. M. (2002). Role of Ca²⁺ on TNF- α and IL-6 secretion from RBL-2H3 mast cells. *Cellular Signalling*, 14(7), 633–639. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00005-0)
- Jha, M. K., Badou, A., Meissner, M., McRory, J. E., Freichel, M., Flockerzi, V., & Flavell, R. A. (2009). Defective survival of naive CD8⁺ T lymphocytes in the absence of the β 3 regulatory subunit of voltage-gated calcium channels. *Nature Immunology*, 10(12),

1275–1282. <https://doi.org/10.1038/ni.1793>

- Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., ... Lee, J. O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, *130*(6), 1071–1082. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.008>
- Johnzon, C. F., Rönnerberg, E., & Pejler, G. (2016). The role of mast cells in bacterial infection. *The American Journal of Pathology*, *186*(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.024>
- 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>
- Katz, B. (1962). The croonian lecture: The transmission of impulses from nerve to muscle, and the subcellular unit of synaptic action. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *155*(961), 455–477. <https://doi.org/10.1098/rspb.1962.0012>
- Katz, B. (1996). Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond. The Fenn lecture. *Journal of Neurocytology*, *25*(12), 677–686. <https://doi.org/10.1007/BF02284834>
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, *34*(5), 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- Kenny, E. F., Quinn, S. R., Doyle, S. L., Vink, P. M., van Eenennaam, H., & O'Neill, L. A. J. (2013). Bruton's tyrosine kinase mediates the synergistic signalling between TLR9 and the B cell receptor by regulating calcium and calmodulin. *PLoS One*, *8*(8), e74103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074103>
- Kim, K. S., Jang, J. H., Lin, H., Choi, S. W., Kim, H. R., Shin, D. H., ... Kim, S. J. (2015). Rise and fall of Kir2.2 current by TLR4 signaling in human monocytes: PKC-dependent trafficking and PI3K-mediated PIP2 decrease. *The Journal of Immunology*, *195*(7), 3345–3354. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500056>
- Kitamura, Y., Shimada, M., Hatanaka, K., & Miyano, Y. (1977). Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature*, *268*(5619), 442–443. <https://doi.org/10.1038/268442a0>
- Kobayashi, T., Nakano, T., Nakahata, T., Asai, H., Yagi, Y., Tsuji, K., ... Kitamura, Y.

- (1986). Formation of mast cell colonies in methylcellulose by mouse peritoneal cells and differentiation of these cloned cells in both the skin and the gastric mucosa of W/W^v mice: evidence that a common precursor can give rise to both “connective tissue-type” an. *The Journal of Immunology*, *136*(4), 1378–1384. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/136/4/1378.long>
- Kobayashi, T., Yamada, Y., Fukao, M., Tsutsuura, M., & Tohse, N. (2007). Regulation of Cav1.2 current: Interaction with intracellular molecules. *Journal of Pharmacological Sciences*, *103*(4), 347–353. <https://doi.org/10.1254/jphs.CR0070012>
- Komuro, A., Masuda, Y., Kobayashi, K., Babbitt, R., Gunel, M., Flavell, R. A., & Marchesi, V. T. (2004). The AHNAKs are a class of giant propeller-like proteins that associate with calcium channel proteins of cardiomyocytes and other cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(12), 4053–4058. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308619101>
- Kotturi, M. F., & Jefferies, W. A. (2005). Molecular characterization of L-type calcium channel splice variants expressed in human T lymphocytes. *Molecular Immunology*, *42*(12), 1461–1474. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.01.014>
- Kulka, M., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., & Metcalfe, D. D. (2004). Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *114*(1), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.049>
- Kushnir-Sukhov, N. M., Brown, J. M., Wu, Y., Kirshenbaum, A., & Metcalfe, D. D. (2007). Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *119*(2), 498–499. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.09.003>
- Lee, C. C., Avalos, A. M., & Ploegh, H. L. (2012). Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nature Reviews Immunology*, *12*(3), 168–179. <https://doi.org/10.1038/nri3151>
- Leon, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L., & Levi-Montalcini, R. (1994). Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(9), 3739–3743. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3739>

- Letari, O., Nicosia, S., Chiavaroli, C., Vacher, P., & Schlegel, W. (1991). Activation by bacterial lipopolysaccharide causes changes in the cytosolic free calcium concentration in single peritoneal macrophages. *The Journal of Immunology*, *147*(3), 980–983. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/147/3/980.long>
- Lindau, M., & Fernandez, J. M. (1986). A patch-clamp study of histamine-secreting cells. *The Journal of General Physiology*, *88*(3), 349–368. <https://doi.org/10.1085/jgp.88.3.349>
- Lindstedt, K. A., Wang, Y., Shiota, N., Saarinen, J., Hyytiäinen, M., Kokkonen, J. O., ... Kovanen, P. T. (2001). Activation of paracrine TGF- β 1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. *The FASEB Journal*, *15*(8), 1377–1388. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0273com>
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. Do, Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E. J., & Meyer, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology*, *15*(13), 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>
- Llinás, R., Sugimori, M., Lin, J. W., & Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(5), 1689–1693. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.5.1689>
- Llinás, R., & Yarom, Y. (1981). Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *The Journal of Physiology*, *315*(1), 549–567. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013763>
- Ma, H. T., Peng, Z., Hiragun, T., Iwaki, S., Gilfillan, A. M., & Beaven, M. A. (2008). Canonical transient receptor potential 5 channel in conjunction with Orai1 and STIM1 allows Sr²⁺ entry, optimal influx of Ca²⁺, and degranulation in a rat mast cell line. *The Journal of Immunology*, *180*(4), 2233–2239. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2233>
- Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L., & Gonzalez-Espinosa, C. (2013). Morphine prevents lipopolysaccharide-induced TNF secretion in mast cells blocking I κ B kinase activation and SNAP-23 phosphorylation: correlation with the formation of a β -arrestin/TRAF6 complex. *The Journal of Immunology*, *191*(6), 3400–3409.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202658>

- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., & Abraham, S. N. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature*, *381*(6577), 77–80. <https://doi.org/10.1038/381077a0>
- Martín-Ávila, A., Medina-Tamayo, J., Ibarra-Sánchez, A., Vázquez-Victorio, G., Castillo-Arellano, J. I., Hernández-Mondragón, A. C., ... González-Espinosa, C. (2016). Protein tyrosine kinase Fyn regulates TLR4-elicited responses on mast cells controlling the function of a PP2A-PKC α/β signaling node leading to TNF secretion. *The Journal of Immunology*, *196*(12), 5075–5088. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501823>
- Martin, L., Pingle, S. C., Hallam, D. M., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2006). Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *316*(1), 71–78. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.091868>
- Mathes, C., & Thompson, S. H. (1994). Calcium current activated by muscarinic receptors and thapsigargin in neuronal cells. *The Journal of General Physiology*, *104*(1), 107–121. <https://doi.org/10.1085/jgp.104.1.107>
- Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H., & Shimada, S. (2004). TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *The Journal of Immunology*, *173*(1), 531–541. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.531>
- Matthews, G., Neher, E., & Penner, R. (1989). Chloride conductance activated by external agonists and internal messengers in rat peritoneal mast cells. *The Journal of Physiology*, *418*(1), 131–144. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017831>
- Matza, D., Badou, A., Klemic, K. G., Stein, J., Govindarajulu, U., Nadler, M. J., ... Flavell, R. A. (2016). T cell receptor mediated calcium entry requires alternatively spliced Cav1.1 channels. *PLoS One*, *11*(1), e0147379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147379>

- Matza, D., Badou, A., Kobayashi, K. S., Goldsmith-Pestana, K., Masuda, Y., Komuro, A., ... Flavell, R. A. (2008). A scaffold protein, AHNAK1, is required for calcium signaling during T cell activation. *Immunity*, 28(1), 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.020>
- Maurer, M., Theoharides, T., Granstein, R. D., Bischoff, S. C., Bienenstock, J., Henz, B., ... Galli, S. (2003). What is the physiological function of mast cells? *Experimental Dermatology*, 12(6), 886–910. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2003.0109a.x>
- McCloskey, M. A., & Qian, Y. X. (1994). Selective expression of potassium channels during mast cell differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(20), 14813–14819. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/269/20/14813.long>
- McKinney, L. C., & Gallin, E. K. (1990). Effect of adherence, cell morphology, and lipopolysaccharide on potassium conductance and passive membrane properties of murine macrophage J774.1 cells. *The Journal of Membrane Biology*, 116(1), 47–56. <https://doi.org/10.1007/BF01871671>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. J. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394–397. <https://doi.org/10.1038/41131>
- Mekori, Y. A., Hershko, A. Y., Frossi, B., Mion, F., & Pucillo, C. E. (2016). Integrating innate and adaptive immune cells: Mast cells as crossroads between regulatory and effector B and T cells. *European Journal of Pharmacology*, 778, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.087>
- Mohr, F. C., & Fewtrell, C. (1987). The relative contributions of extracellular and intracellular calcium to secretion from tumor mast cells. Multiple effects of the proton ionophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(22), 10638–10643. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/262/22/10638.long>
- Molteni, M., Gemma, S., & Rossetti, C. (2016). The role of Toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/6978936>
- Moon, T. C., St Laurent, C. D., Morris, K. E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y., & Befus, A. D. (2010). Advances in mast cell biology: new understanding of

- heterogeneity and function. *Mucosal Immunology*, 3(2), 111–128. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.136>
- Nadler, M. J. S., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A. L., Zhu, Q., Stokes, A. J., ... Fleig, A. (2001). LTRPC7 is a Mg²⁺-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, 411(6837), 590–595. <https://doi.org/10.1038/35079092>
- Nakata, Y., & Hide, I. (1998). Calcium signaling and protein kinase C for TNF- α secretion in a rat mast cell line. *Life Sciences*, 62(17–18), 1653–1657. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00123-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00123-4)
- Navedo, M. F., Amberg, G. C., Votaw, V. S., & Santana, L. F. (2005). Constitutively active L-type Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11112–11117. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500360102>
- Neher, E. (1988). The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum. *The Journal of Physiology*, 395(1), 193–214. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016914>
- Nelson, D. J., Jow, B., & Jow, F. (1992). Lipopolysaccharide induction of outward potassium current expression in human monocyte-derived macrophages: Lack of correlation with secretion. *The Journal of Membrane Biology*, 125(3), 207–218. <https://doi.org/10.1007/BF00236434>
- Noli, C., & Miolo, A. (2001). The mast cell in wound healing. *Veterinary Dermatology*, 12(6), 303–313. <https://doi.org/10.1046/j.0959-4493.2001.00272.x>
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., & Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316(6027), 440–443. <https://doi.org/10.1038/316440a0>
- Omilusik, K., Priatel, J. J., Chen, X., Wang, Y. T., Xu, H., Choi, K. B., ... Jefferies, W. A. (2011). The Cav1.4 calcium channel is a critical regulator of T cell receptor signaling and naive T cell homeostasis. *Immunity*, 35(3), 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.011>
- Otsu, K., Nakano, T., Kanakura, Y., Asai, H., Katz, H. R., Austen, K. F., ... Kitamura, Y. (1987). Phenotypic changes of bone marrow-derived mast cells after intraperitoneal transfer into W/W^v mice that are genetically deficient in mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 165(3), 615–627. <https://doi.org/10.1084/jem.165.3.615>

- Parekh, A. B., & Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiological Reviews*, 77(4), 901–930. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.4.901>
- Parekh, A. B., & Putney, J. W. J. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
- Park, C. Y., Shcheglovitov, A., & Dolmetsch, R. (2010). The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science*, 330(6000), 101–105. <https://doi.org/10.1126/science.1191027>
- Pelletier, C., Guérin-Marchand, C., Iannascoli, B., Marchand, F., David, B., Weyer, A., & Blank, U. (1998). Specific signaling pathways in the regulation of TNF- α mRNA synthesis and TNF- α secretion in RBL-2H3 mast cells stimulated through the high affinity IgE receptor. *Inflammation Research*, 47(12), 493–500. <https://doi.org/10.1007/s000110050364>
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T. P., & Campbell, K. P. (1994). Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I–II cytoplasmic linker of the α 1-subunit. *Nature*, 368(6466), 67–70. <https://doi.org/10.1038/368067a0>
- Putney, J. W. J. (1987). Formation and actions of calcium-mobilizing messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate. *The American Journal of Physiology*, 252(2 Pt 1), G149-157. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1987.252.2.G149>
- Putney, J. W. J., 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. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/114/12/2223.long>
- Qi, X., Hong, J., Chaves, L., Zhuang, Y., Chen, Y., Wang, D., ... Huang, H. (2013). Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBP α and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity*, 39(1), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.012>
- Randall, A., & Tsien, R. W. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(4), 2995–3012. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-04-02995.1995>
- Randriamampita, C., Bismuth, G., Debré, P., & Trautmann, A. (1991). Nitrendipine-induced inhibition of calcium influx in a human T-cell clone: Role of cell

- depolarization. *Cell Calcium*, 12(4), 313–323. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(91\)90005-Y](https://doi.org/10.1016/0143-4160(91)90005-Y)
- Rao, K. N., & Brown, M. A. (2008). Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143(1), 83–104. <https://doi.org/10.1196/annals.1443.023>
- Redegeld, F. A., Yu, Y., Kumari, S., Charles, N., & Blank, U. (2018). Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunological Reviews*, 282(1), 87–113. <https://doi.org/10.1111/imr.12629>
- Riley, J. F. (1953). Histamine in tissue mast cells. *Science*, 118(3064), 332. <https://doi.org/10.1126/science.118.3064.332>
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 588–593. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588>
- Romanin, C., Reinsprecht, M., Pecht, I., & Schindler, H. (1991). Immunologically activated chloride channels involved in degranulation of rat mucosal mast cells. *The EMBO Journal* (Vol. 10). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04926.x>
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., ... Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *The Journal of Cell Biology*, 169(3), 435–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>
- Rowley, D. A., Benditt, E. P., Arase, M., & Roeper, E. (1956). 5-Hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. *The Journal of Experimental Medicine*, 103(4), 399–412. <https://doi.org/10.1084/jem.103.4.399>
- Schappe, M. S., Sztejn, K., Stremaska, M. E., Mendu, S. K., Downs, T. K., Seegren, P. V., ... Desai, B. N. (2018). Chanzyme TRPM7 mediates the Ca²⁺ influx essential for lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 endocytosis and macrophage activation. *Immunity*, 48(1), 59–74.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.026>
- Schwartz, L. B., & Austen, K. F. (1980). Enzymes of the mast cell granule. *The Journal of Investigative Dermatology*, 74(5), 349–353. [68](https://doi.org/10.1111/1523-</p></div><div data-bbox=)

1747.ep12543620

- Schwartz, L. B., Austen, K. F., & Wasserman, S. I. (1979). Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *The Journal of Immunology*, *123*(4), 1445–1450. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/123/4/1445>
- Schwartz, L. B., Lewis, R. A., Seldin, D., & Austen, K. F. (1981). Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *The Journal of Immunology*, *126*(4), 1290–1294. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/126/4/1290.long>
- Seabra, V., Stachlewitz, R. F., & Thurman, R. G. (1998). Taurine blunts LPS-induced increases in intracellular calcium and TNF- α production by Kupffer cells. *Journal of Leukocyte Biology*, *64*(5), 615–621. <https://doi.org/10.1002/jlb.64.5.615>
- Shao, Y., Czymmek, K. J., Jones, P. A., Fomin, V. P., Akanbi, K., Duncan, R. L., & Farach-Carson, M. C. (2009). Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive calcium channel Cav1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *296*(5), C1067–C1078. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00427.2008>
- Shaw, A. S., & Filbert, E. L. (2009). Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nature Reviews Immunology*, *9*(1), 47–56. <https://doi.org/10.1038/nri2473>
- Shtivelman, E., Cohen, F. E., & Bishop, J. M. (1992). A human gene (AHNAK) encoding an unusually large protein with a 1.2-microns polyionic rod structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(12), 5472–5476. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5472>
- Sjoerdsma, A., Waalkes, T. P., & Weissbach, H. (1957). Serotonin and histamine in mast cells. *Science*, *125*(3259), 1202–1203. <https://doi.org/10.1126/science.125.3259.1202>
- Sonoda, T., Ohno, T., & Kitamura, Y. (1982). Concentration of mast-cell progenitors in bone marrow, spleen, and blood of mice determined by limiting dilution analysis. *Journal of Cellular Physiology*, *112*(1), 136–140. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041120120>
- Stokes, L., Gordon, J., & Grafton, G. (2004). Non-voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in human T cells: pharmacology and molecular characterization of the major alpha pore-

- forming and auxiliary beta-subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19566–19573. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401481200>
- Stokes, L., MacKenzie, A. B., & Sluyter, R. (2016). Editorial: Roles of ion channels in immune cells. *Frontiers in Immunology*, 7, 48. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00048>
- Su, J., Zhou, H., Liu, X., Nilsson, J., Fredrikson, G. N., & Zhao, M. (2017). oxLDL antibody inhibits MCP-1 release in monocytes/macrophages by regulating Ca²⁺ /K⁺ channel flow. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(5), 929–940. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13033>
- Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., & Ogawa, H. (2002). Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(10), 1351–1359. <https://doi.org/10.1172/JCI14704>
- Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., & Ogawa, H. (2001). Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology*, 167(4), 2250–2256. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.2250>
- Suzuki, Y., Yoshimaru, T., Inoue, T., Nunomura, S., & Ra, C. (2008). The high-affinity immunoglobulin E receptor (FcεRI) regulates mitochondrial calcium uptake and a dihydropyridine receptor-mediated calcium influx in mast cells: Role of the FcεRIβ chain immunoreceptor tyrosine-based activation motif. *Biochemical Pharmacology*, 75(7), 1492–1503. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.12.006>
- Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F., & Catterall, W. A. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), 5478–5482. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5478>
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., ... Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328(6128), 313–318. <https://doi.org/10.1038/328313a0>
- Tang, L., Gamal El-Din, T. M., Swanson, T. M., Pryde, D. C., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2016). Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca²⁺ channel

- by Ca^{2+} antagonist drugs. *Nature*, 537(7618), 117–121. <https://doi.org/10.1038/nature19102>
- Tang, S., Chen, T., Yang, M., Wang, L., Yu, Z., Xie, B., ... Wang, J. (2017). Extracellular calcium elicits feedforward regulation of the Toll-like receptor-triggered innate immune response. *Cellular & Molecular Immunology*, 14(2), 180–191. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.59>
- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., & Shimizu, T. (2013). Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science*, 339(6126), 1426–1429. <https://doi.org/10.1126/science.1229159>
- Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19(11), 2396–2404. <https://doi.org/10.1021/bi00552a018>
- Uchida, R., Xiang, H., Arai, H., Kitamura, H., & Nishida, K. (2018). L-type calcium channel-mediated Zinc wave is involved in the regulation of IL-6 by stimulating non-IgE with LPS and IL-33 in mast cells and dendritic cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00565>
- van Haaster, C. M. C. J., Engels, W., Lemmens, P. J. M. R., Hornstra, G., van der Vusse, G. J., & Heemskerk, J. W. M. (1995). Differential release of histamine and prostaglandin D2 in rat peritoneal mast cells: roles of cytosolic calcium and protein tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1265(1), 79–88. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)00210-6](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)00210-6)
- Van Petegem, F., Clark, K. A., Chatelain, F. C., & Minor, D. L. J. (2004). Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel β -subunit and an α -subunit domain. *Nature*, 429(6992), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nature02588>
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., ... Kinet, J.-P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science*, 312(5777), 1220–1223. <https://doi.org/10.1126/science.1127883>
- Visentin, S., Agresti, C., Patrizio, M., & Levi, G. (1995). Ion channels in rat microglia and their different sensitivity to lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Journal of Neuroscience Research*, 42(4), 439–451. <https://doi.org/10.1002/jnr.490420402>
- Vogel, S. Z., Schlickeiser, S., Jürchott, K., Akyuev, L., Schumann, J., Appelt, C., ...

- Sawitzki, B. (2015). TCAIM decreases T cell priming capacity of dendritic cells by inhibiting TLR-induced Ca²⁺ influx and IL-2 production. *The Journal of Immunology*, *194*(7), 3136–3146. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400713>
- Waithe, D., Ferron, L., Page, K. M., Chaggar, K., & Dolphin, A. C. (2011). Beta-subunits promote the expression of Ca(V)₂.2 channels by reducing their proteasomal degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(11), 9598–9611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.195909>
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., ... Gill, D. L. (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science*, *330*(6000), 105–109. <https://doi.org/10.1126/science.1191086>
- Welle, M. (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *Journal of Leukocyte Biology*, *61*(3), 233–245. <https://doi.org/10.1002/jlb.61.3.233>
- Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, *14*(7), 478–494. <https://doi.org/10.1038/nri3690>
- Wheeler, M., Stachlewitz, R. F., Yamashina, S., Ikejima, K., Morrow, A. L., & Thurman, R. G. (2000). Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *The FASEB Journal*, *14*(3), 476–484. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.3.476>
- Wischmeyer, E., Lentz, K. U., & Karschin, A. (1995). Physiological and molecular characterization of an IRK-type inward rectifier K⁺ channel in a tumour mast cell line. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *429*(6), 809–819. <https://doi.org/10.1007/BF00374805>
- Woska, J. R. J., & Gillespie, M. E. (2012). SNARE complex-mediated degranulation in mast cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(4), 649–656. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01443.x>
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, *249*(4975), 1431–1433. <https://doi.org/10.1126/science.1698311>
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., ... Yan, N. (2016). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*, *537*(7619), 191–

196. <https://doi.org/10.1038/nature19321>
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., & Yan, N. (2015). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science*, *350*(6267), aad2395-1-aad2395-9. <https://doi.org/10.1126/science.aad2395>
- Wulff, B. C., & Wilgus, T. A. (2013). Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Experimental Dermatology*, *22*(8), 507–510. <https://doi.org/10.1111/exd.12169>
- Wykes, R. C. E., Lee, M., Duffy, S. M., Yang, W., Seward, E. P., & Bradding, P. (2007). Functional transient receptor potential melastatin 7 channels are critical for human mast cell survival. *The Journal of Immunology*, *179*(6), 4045–4052. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.4045>
- Yamasaki, S., Hasegawa, A., Hojyo, S., Ohashi, W., Fukada, T., Nishida, K., & Hirano, T. (2012). A novel role of the L-type calcium channel $\alpha 1D$ subunit as a gatekeeper for intracellular zinc signaling: zinc wave. *PLoS One*, *7*(6), e39654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039654>
- Ye, Y., Huang, X., Zhang, Y., Lai, X., Wu, X., Zeng, X., ... Zeng, Y. (2012). Calcium influx blocked by SK&F 96365 modulates the LPS plus IFN- γ -induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages. *International Immunopharmacology*, *12*(2), 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.12.011>
- Yoshimaru, T., Suzuki, Y., Inoue, T., & Ra, C. (2009). L-type Ca^{2+} channels in mast cells: Activation by membrane depolarization and distinct roles in regulating mediator release from store-operated Ca^{2+} channels. *Molecular Immunology*, *46*(7), 1267–1277. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.11.011>
- Yu, F. H., & Catterall, W. A. (2004). The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, *2004*(253), re15. <https://doi.org/10.1126/stke.2532004re15>
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological Reviews*, *67*(4), 821–870. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
- Zhang, C., Baumgartner, R. A., Yamada, K., & Beaven, M. A. (1997). Mitogen-activated

protein (MAP) kinase regulates production of tumor necrosis factor- α and release of arachidonic acid in mast cells. Indications of communication between p38 and p42 MAP kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13397–13402. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13397>

Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H. F., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., ... Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9357–9362. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603161103>

Zhou, X., Yang, W., & Li, J. (2006). Ca²⁺- and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor- κ B activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31337–31347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602739200>

Zhu, F. G., & Marshall, J. S. (2001). CpG-containing oligodeoxynucleotides induce TNF- α and IL-6 production but not degranulation from murine bone marrow-derived mast cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(2), 253–262. <https://doi.org/10.1189/jlb.69.2.253>