



Universitat Autònoma
de Barcelona

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

Prostaglandina E₂ en la activación osmótica inducida por manitol en el mastocito

Tesis doctoral presentada por:

Ivonne Marisol Torres Atencio

Directores de la tesis:

Dr. César Picado

Dra. Margarita Martín

AGRADECIMIENTOS

“La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante” *Paulo Coelho*

Cada momento de nuestras vidas tiene algo de especial, y cuando somos capaces de alcanzar las metas que nos hemos o las circunstancias nos han propuestos, aún lo son más. Esto es lo que me ha sucedido al culminar mi formación pre-doctoral y poder leer mi tesis. Gracias a la dirección de dos excelentes profesionales, la Doctora Margarita Martín y el Doctor César Picado, por el tiempo y la dedicación que me prestaron durante mi estancia en el laboratorio y fuera de él. Gracias al Doctor Fernando de Mora, quien tuvo la visión de introducirme en el grupo de Inmunoalergia Respiratoria, donde me he desenvuelto como pez en el agua. Mi agradecimiento extensivo a la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de la República de Panamá, así como al Instituto de Formación y Aprovechamiento de los Recursos Humanos, que con el programa de Becas de Excelencia Profesional, me permitieron los medios económicos y logísticos para la realización de mis estudios doctorales.

Quiero agradecer a Dios Todopoderoso, por el aliento divino cada mañana de estos cuatro años. A la mujer que me dio la vida, mi madre “La Doña”, mi mayor inspiración y guía. A dos seres que aunque en su inocencia me permitieron apartarme de su lado, privándose de crecer conmigo, mis hijos, Adriana y Javier Enrique, son a quienes les dedico con todo el amor que una persona puede sentir, el fruto de mi esfuerzo. Al padre de mis hijos, por su paciencia y hacerse cargo del timón del barco de nuestro hogar. También al empuje de mis hermanas, principalmente Jacky quien además tuvo la oportunidad de visitarme y ser participe de la culminación de mi formación. A mis cuñados, José Gustavo y Eustiquio, quienes estaban encantados con la ciudad que me acogió, Barcelona.

Pero no solo mi familia en Panamá, son dueñas de mi agradecimiento; he sido adoptada por muchas familias en Cataluña, a la familia Oliver-Vila, especialmente mi maestra en el laboratorio, Irene; con quien compartimos muchos buenos momentos y otros no tanto, pero con mucho cariño. A mi otra nena, Erola junto con su madre Conchita que me adoptaron como otra hermana e hija más; la dulzura de ellas nunca me abandonaron, y Erola se convirtió este último año en la persona que mejor me

conocía apenas llegaba al laboratorio, logrando que cualquier mal momento se transformara en una anécdota. Adriana, quien es la persona que mejor conoce Barcelona, y a quien ante cualquier duda de qué hacer, siempre tenía opciones y tan positiva como siempre, con su eterna sonrisa, herencia de una madre cariñosa y alegre, Carmen. Y mis niños, Jordi Sintes compañero de nuestras comidas y el café, y desde luego compartir cada momento con un sentido del humor muy peculiar y cómplice. Borja, quien me demostró tantas veces lo mucho que creía en mí, y su admiración, actitudes que siempre me enternecieron y que junto a sus padres y hermanos, me mostraron lo apasionados que pueden ser cuando haces lo que te gusta y de corazón. El Siscu, quien siempre fue como un alfiler, que pinchaba pero no me dejaba sangrar, tratando de que abriera mi mente y ojos a cosas nuevas. A María y Jordi Roca, equipo NASA, gracias por su invaluable ayuda y colaboración, además de ser excelente compañeros de trabajo. A todo el equipo de compañeros del IDIBAPS, Ester, Nel, Maricarmen, Natalia, Elena, David Peinado, Isabel, Cristina; muchas gracias, por todo el apoyo tanto personal como laboral.

Finalmente, y no menos importantes a las personas que han vivido conmigo fuera del área de laboratorio. Montse y Miguel, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón, junto con sus hijos y los abuelos; gracias por ser más que mis caseros; mi otra familia. A Grey y Carolina mis compañeros y amigos en casa, con quienes las horas que no tenía la mente ocupada con la faena, teníamos nuestras comidas juntos, las salidas al cine y a bailar, dos de mis grandes pasiones, ustedes hicieron la diferencia. También tengo que agradecer a Jordi Erasmo, por todos los libros, chocolates, películas y cervezas que compartimos y más, quien siempre ante cualquier duda médica, preguntaba, confiado de mis conocimientos tanto o más que yo, aunque no hiciera caso a mis recomendaciones.

Todos ustedes que han estado a mi lado, tanto dentro del laboratorio como fuera de estas paredes, han contribuido como granitos de arena a construir los más bellos recuerdos de estos cuatro años fuera de Panamá. Cada risa, cada preocupación, cada lágrima, cada sueño que juntos realizamos durante este tiempo serán imborrables. Muchas Gracias y que Dios y la Virgen los bendiga a todos...

INDICE

	Página
RESUMEN	1
I INTRODUCCION	3
1 Asma	5
1.1 Definición, Factores de riesgo y Clasificación	5
1.2 Epidemiología	6
1.3 Tratamientos	7
1.4 Asma bronquial como proceso inflamatorio	9
2 Mastocito	10
2.1 Generalidades del mastocito en el asma	10
2.2 Biología básica del mastocito	10
2.3 Morfología y distribución	11
2.4 Clasificación fenotípica	12
2.5 Activación del Mastocito	13
2.5.1 Vía Inmunológica o dependiente de IgE	13
2.5.2 Vía no Inmunológica	14
2.6 Mediadores del mastocito	17
2.6.1 Mediadores preformados	18
2.6.2 Mediadores sintetizados <i>de novo</i>	19
2.7 Funciones del mastocito	27
2.7.1 Funciones Inmunomoduladoras del mastocito	27
2.8 Otras patologías en la que está involucrado el mastocito	29
2.9 Papel del mastocito en el asma	30
2.9.1 Papel del mastocito en el remodelado de las vías aéreas	30
2.9.2 El mastocito como herramienta en el estudio del asma	32
3 Asma inducida por ejercicio	35
3.1 Hipótesis osmótica	35
3.2 Papel de la PGE ₂ en el AIE	36
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	39
III MATERIALES Y METODOS	43
1 Líneas celulares	45
1.1 Cultivo Primario de mastocitos provenientes de CD34+	45
1.2 Cultivo primario de mastocitos aislados a partir de pulmón	46
2 Análisis de expresión de genes	50
3 Ensayos de liberación de β -hexosaminidasa	54
4 Citometría de flujo	55
4.1 Análisis de expresión de la proteína de membrana CD63	56
5 Estudio de reorganización de citoesqueleto	57
6 Ensayo de actividad de ERK, P38, JNK y AKT y expresión de receptores EP	60
7 Silenciamiento de ciclooxigenasas mediante el uso de ARN de interferencia (siRNA)	64
8 Determinación de calcio por fluorimetría	66
9 Determinación de la producción de Prostaglandina E ₂ mediante un ensayo Inmuno enzimático	67
IV RESULTADOS	69

	Página
A Influencia de los cambios osmóticos en el mastocito humano	71
A.1 Elección del agente osmótico	71
A.2 Ensayo del estímulo osmótico en mastocitos de diferentes orígenes	72
A.2.1 Caracterización de la población de mastocitos por la expresión del receptor FcεRI y c-kit	72
A.2.2 Perfil de liberación de β-hexosaminidasa inducido con Manitol mastocitos procedentes de diferentes orígenes	75
A.3 Activación de los mastocitos mediante activación del CD63	75
A.4 Efecto del Estímulo Osmótico en el Flujo de Calcio	76
A.5 Efecto del estímulo osmótico en la Dinámica del Citoesqueleto mediante el marcaje con Faloidina	80
A.6 Efecto del Estímulo Osmótico en las vía de activación de las MAP quinasas ERK1/2 y Akt.	82
A.7 Efectos de los Inhibidores de MAP quinasas y PI3 quinasa en la activación osmótico de mastocitos	85
A.8 Efecto del estímulo osmótico en la síntesis y liberación de otros mediadores inflamatorios	87
A.8.1 Efecto del estímulo osmótico en la síntesis y liberación de otros mediadores inflamatorios	88
A.8.2 Síntesis de citocinas inducidas por el estímulo osmótico	88
B Modulación de la activación del mastocito por cambios osmóticos en respuesta a la inhibición de las Ciclooxygenasas.	90
B.1 Silenciamiento de las Ciclooxygenasas COX-1/COX-2 mediante el uso del ARN de interferencia (siRNA).	91
B.2 Inhibición Farmacológica de COXs	93
B.3 Evaluación del efecto del estímulo osmótico en la vía de señalización de las MAP quinasas en presencia de Inhibidores de COXs:	94
C Efecto de la activación del mastocito por cambios osmóticos modulados en respuesta a Prostaglandina E2 (PGE2)	97
C.1 Determinación de la Dosis de Prostaglandina E2 capaz de modular la activación del mastocito por cambios osmóticos.	97
C.2 Caracterización de la expresión de receptores de Prostaglandina E2 en el mastocito	99
C.2.1 Mediante PCR a tiempo real (RT-PCR).	99
C.2.2 Mediante western blot	100
C.2.2a Western Blot del Receptor EP1	100
C.2.2b Western Blot del Receptor EP2	101
C.2.2c Western Blot del Receptor EP3	101
C.2.2d Western Blot del Receptor EP4	102
C.3 Modulación de los efectos de Prostaglandina E2 en el mastocito con el uso de Antagonista de receptores de EP en la activación osmótica	103
C.3.1 Efecto del Manitol y la Prostaglandina E2 en el Receptor EP4	104
C.3.2 Efecto del Manitol y la Prostaglandina E2 en el Receptor EP3	105
C.3.3 Efecto del Manitol y la Prostaglandina E2 en el Receptor EP2	105
C.4 Efecto de la Prostaglandina E2 y Antagonistas de los receptores de EP en la activación osmótica inducida por Manitol en mastocitos obtenidos de cultivos primarios.	108
C.5 Efecto de la Prostaglandina E2 y Antagonistas de los receptores de EP con la activación osmótica inducida por Manitol en el flujo de Calcio.	110

C.6	Evaluación del Efecto de Prostaglandina E ₂ y los Antagonistas de EP con la activación osmótica inducida por Manitol en las vías de las MAP quinasas	113
C.7	Efecto de Prostaglandina E ₂ en la dinámica del citoesqueleto en presencia del estímulo osmótico	119
C.8	Evaluación del efecto de la Prostaglandina E ₂ en la síntesis de citocinas	120
V	DISCUSION	123
1	El estímulo osmótico es capaz de inducir la activación del mastocito	126
2	Cómo se ve afectada la activación del mastocito por el estímulo osmótico cuando se inhiben las Ciclooxygenasas	130
3	Prostaglandina E ₂ , expresión de receptores en el mastocito, modulación del estímulo osmótico y otros aspectos asociados a la transducción de señal.	132
4	¿Qué se sabe del papel de PGE ₂ en modelos animales?	136
5	Posibilidades en Terapia	137
VI	CONCLUSIONES	141
VII	BIBLIOGRAFIA	145

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

AC: adenil ciclasa

AIE: asma inducida por ejercicio

AINES: analgésicos antiinflamatorios no-esteroidales

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

AP1: proteína activadora 1

APS: Ammonium Persulfate

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ASA ó AAS: ácido acetil salicílico-aspirina

BIE: broncoconstricción inducida por ejercicio

BSA: Bovine serum albumin (Albúmina sérica bovina).

BTK: Burton's Tyrosine Kinase COX

Ca²⁺: calcio

c-Kit: CD117

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CysLT: cisteinil leucotrienos

DAG: diacilglicerol

DC: células dendríticas

DP: receptor de prostaglandina D

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECA: enzima convertidora de angiotensina

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo de Inmuno absorción ligada a enzima)

ERK: Extracellular-signal-regulated kinase 1 (Cinasa regulada per señales extracelulares).

FACS: Fluorescence Analyzer Cell Sorter (Separador de células analizadas por fluorescencia).

F-actina: Actina Filamentosa

FcεRI: Receptor de alta afinidad para la IgE

FCS: Suero bovino fetal

EP: receptor de prostaglandina E

G-actina: Actina Globular

GDP: Difosfato de Guanosina
GMPc: monofosfato de guanina cíclico
GPCRs: G-protein-coupled receptors (Receptores acoplados a proteína G)
GTP: Trifosfato de guanosina
HMC-1: Human Mast Cell line 1
HuMCL: Human Mast Cell Lung
HuMCs CD34+: Human Mast Cell from CD34+
IgE: Inmunoglobulina E
IL: Interleucina.
IP3 (InsP3): Inositol 1,4,5-trisphosphate (Inositol 1,4,5-trifosfato)
JNK: JUN amino-terminal kinase (cinasa amino-terminal de JUN)
KCa: canal de calcio dependiente de potasio
LAD-2: Laboratory of allergic diseases 2
LOX: Lipooxigenasa
LT: leucotrienos
MAPK: Mitogen-activated protein kinases (quinasas de proteínas activadas por mitógeno)
NF- κ B: Nuclear factor- κ B (Factor nuclear κ B)
NO: óxido nítrico
PAF: Platelet-activation factor (Factor activador de plaquetas)
PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PE: Phycocerythrin (Ficoeritrina)
PG: Prostaglandina
PGI₂: prostaciclina
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase (Fosfoinositol 3-cinasa)
PIP2 (PtdIns(4,5)P2): Fosfatidilinositol 4,5-bisphosphate (Fosfatidil inositol 4,5-Bifosfato)
PIP3 (PtdIns(4,5)P3): Fosfatidilinositol 3,4,5-trisphosphate (Fosfatidil inositol 3,4,5-Trifosfato)
PKA: proteína quinasa A
PKC: proteína quinasa C
PLA: Fosfolipasa A
PLC: Fosfolipasa C
PLD: Fosfolipasa D
PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (Forbol 12-Miristato 13-Acetato)

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fenilmetilsulfonil Fluor)

PTK: Proteína tirosina cinasa

PVDF: Polyvinylidene fluoride

RFU: Relative Fluorescence Unit (Unidades relativas de fluorescencia)

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real)

SCF: Stem cell factor

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis de geles de poliacrilamida de sulfato dodecil de sodio)

SFM: Serum Free Media (Medio libre de suero)

siRNA: short interference ribonucleic acid (ácido ribonucleico de interferencia)

TBS-T: Tris-Buffered Saline Tween-20 (Solución salina con Tween-20 tamponada con Tris)

TH: T Helper

TLR: Toll-Like Receptor

TNF: Tumor-necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)

TRITC: Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate (Tetrametil rodamina iso-tiocianato)

Tx: tromboxanos

WB: Western Blot

RESUMEN

El mastocito es una célula importante en el asma y otras enfermedades inflamatorias. En asmáticos se ha encontrado un incremento en el número de mastocitos en las vías aéreas del músculo liso y esto se ha relacionado con hipersensibilidad de las vías aéreas. Un estímulo lesivo podría generar broncoconstricción en sujetos con asma y el ejercicio es uno de estos estímulos. El mecanismo por el cual el ejercicio induce broncoconstricción (EIB) se explica por el aumento en la osmolaridad del fluido de las vías respiratorias. Esto puede activar el mastocito y por lo tanto liberar mediadores que actúan en el músculo liso bronquial y la periferia; entre los mediadores además de los preformados, también los sintetizados *de novo* y activar una serie de eventos intracelulares que generarían mayores cambios y producir una respuesta más seria que la broncoconstricción *per se*. Entre los mediadores sintetizados *de novo* de mayor relevancia para nuestro estudio, está la prostaglandina E₂ (PGE₂), metabolito del ácido araquidónico (AA) que tiene efectos antiinflamatorios en las vías respiratoria, que depende de su interacción con sus respectivos receptores.

El objetivo de esta tesis era estudiar como la PGE₂ modula los efectos mediados en la activación osmótica en el mastocito, como modelo *in vitro* de asma inducida por ejercicio. Para esto se utilizó como agente osmótico el manitol y tanto líneas celulares como cultivos primarios de mastocitos, estudiando los aspectos más relevantes que envuelven la maquinaria de activación mastocitaria, desde la evaluación del proceso de desgranulación, el flujo de calcio, morfología del mastocito y en mecanismos de señalización como las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAP quinasas (mediadores importantes en los procesos inflamatorios involucrados en la inmunidad innata y adaptativa). También se caracterizó mediante que receptores la PGE₂ ejerce sus efectos beneficiosos en una situación concreta como la activación osmótica, al igual que la intervención en el metabolismo del AA con el uso de antagonistas de las ciclooxigenasas (COXs), enzimas responsables de la producción de eicosanoides, entre ellos la PGE₂ en particular importante para este trabajo.

En conclusión, encontramos que en la activación del mastocito por parte del manitol, este genera liberación de mediadores y producción de citocinas y de PGE₂, además de producir cambios en la dinámica del citoesqueleto, y activación de las MAP quinasas que inducen cambios a largo plazo en la síntesis de quimiocinas que producen la migración de células inflamatorias, proliferación de las mismas, y pérdida de la homeostasis del mastocito; pero que estos cambios pueden ser prevenidos con el uso de PGE₂, que actuando en los receptores EP₂ y EP₄, reducen la reactividad del

mastocito ante el estímulo osmótico, reducen la movilización de calcio, posiblemente por el efecto de aumento del AMPc propio de la activación a través de la Proteína Gs, de estos receptores, además de reducir la dinámica de reorganización del citoesqueleto estabilizando la polimerización de la actina, como efectos más relevantes. El hecho de que una sustancia que normalmente es producida por el mismo organismo pueda modular estas acciones frente a un estímulo inespecífico como el osmótico, hacen de la PGE₂ una opción terapéutica a contemplar en procesos alérgicos e inflamatorios de estados patológicos como el asma.

INTRODUCCION

I. INTRODUCCIÓN

1. Asma

1.1 Definición, Factores de riesgo y Clasificación

El asma es un trastorno heterogéneo de componente alérgico, en la mayoría de los casos, caracterizado por una obstrucción variable del flujo de aire, el cual es reflejo de la contracción del músculo liso bronquial, inflamación de las vías aéreas, hiperreactividad e hipersecreción de moco (Marone et al, 2005). Para muchos pacientes este padecimiento tiene sus raíces en la infancia. En los primeros años de vida, las infecciones virales del tracto respiratorio producen episodios de sibilancia, en algunos casos transitorio, pero en otros llega a ser un síntoma persistente que puede disiparse en la adolescencia o continuar en la edad adulta (Busse & Lemanske, 2001).

Los factores de riesgo relacionados al desarrollo de asma se han evaluado en el contexto del inicio de la enfermedad, exposición ambiental, estilo de vida, condiciones de co-morbilidad, entre otras. Los factores genéticos también contribuyen significativamente a la expresión y severidad de la enfermedad y recientes evaluaciones farmacogenéticas, en relación al uso de beta agonistas y corticoides, proporcionan información con respecto a la variabilidad en la respuesta de los pacientes asmáticos al tratamiento (Lemanske & Busse, 2010).

Así mismo los factores exacerbantes como alérgenos, infecciones del tracto respiratorio, ejercicio, uso de analgésico antiinflamatorio no esteroideos (AINEs), el reflujo gastroesofágico o factores psicosociales, contribuyen a la progresión y severidad de la enfermedad (Lemanske & Busse, 2010).

La complejidad del asma no solo es en relación con los factores de riesgo o exacerbantes, también para la clasificación del fenotipo asmático, así como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Fenotipos de Asma. Tomada de Wardlaw et al, 2002.

CLASIFICACION	TIPO
Basada en los síntomas	Crónica (leve, moderada, severa) Asma severa aguda "Brittle" asma o inestable Nocturna Inducida por ejercicio
Etiológica	Extrínseca (atópica) Intrínseca (no-atópico) Inducida por virus Ocupacional Atletas de alto rendimiento
Patológica	Eosinofílica Neutrofílica Obstrucciones del flujo de aire (remodelado de las vías aéreas)

1.2 Epidemiología

Las enfermedades alérgicas son el resultado de una respuesta inmune aberrante contra proteínas inocuas del medio ambiente (Nauta et al, 2008). El asma es una de las enfermedades crónicas más comunes que afecta a un estimado de 300 millones de personas alrededor del mundo (Masoli et al, 2004). Se estima que afecta al 10% de niños y 5% de adultos, causando un aumento de la morbilidad y mortalidad en países industrializados (Woodman et al, 2008).

La prevalencia de las enfermedades alérgicas y el asma se ha incrementado marcadamente en la segunda mitad del siglo pasado, especialmente en los países occidentales. Diferentes hipótesis se han postulado para tratar de explicar el incremento en la prevalencia; una de las que se propone es la llamada "hipótesis de la higiene", que sugiere que al mejorar las condiciones higiénicas, ya sea por las mejoras en la salud pública, el uso de vacunas y antibióticos, han reducido la incidencia de infecciones que normalmente podrían estimular el sistema inmune y consecuentemente proteger contra el desarrollo de respuestas alérgicas a sustancias inocuas del medio ambiente. Diversos estudios epidemiológicos han contrastado que los niños procedentes de grandes familias o que son llevados a guarderías tienen un

riesgo reducido de desarrollar asma; aún así estos hallazgos son un tanto controversiales (Nauta et al, 2008).

1.3 Tratamientos

La terapia farmacológica del asma emplea fármacos cuyo objetivo es reducir la inflamación y más directamente reducir el broncoespasmo. Resulta lógico suponer que el tratamiento del asma, más allá del desencadenante, producirá un beneficio para la calidad de vida de estos pacientes, lo que incluye una mejor tolerancia a los esfuerzos físicos y otras actividades.

El tratamiento con fármacos antiinflamatorios es de elección para el manejo del asma crónica, ya que permite mantener el control de la actividad de la enfermedad que incluye el control de los síntomas desencadenados por el ejercicio. Allí, los esteroides inhalados constituyen la primera línea.

a. Corticosteroides

La inflamación mediada por las células T_H2 en las vías aéreas de los pacientes asmáticos es suprimida por los corticoides a través de la inhibición de la expresión de citocinas, quimocinas y moléculas de adhesión, las cuales codifican genes que son regulados por factores de transcripción como el factor nuclear NF- κ B y la proteína activador 1 (AP1). El corticoide libre difunde a través de la membrana celular, donde interactúa con el receptor de glucocorticoides en el citoplasma, esto resulta en la activación del receptor y la subsecuente translocación al núcleo, donde la actividad transcripcional de los genes es modulado por diferentes mecanismos (Barnes & Adcock, 2003).

b. Agonista de los receptores β_2 :

Los agonista de los receptores beta 2 de corta acción, como el salbutamol y la terbutalina son los broncodilatadores disponibles más efectivos por el alivio rápido de los síntomas del asma. Luego de la unión del agonista al receptor beta 2, se activa la adenilato ciclasa mediante la señal de transducción vía proteína Gs incrementando la producción de monofosfato de adenosina cíclico o AMPc (siglas en inglés), y por lo tanto activando la proteína quinasa A (PKA). Esto media relajación del músculo liso bronquial a través de la fosforilación de la cadena ligera de miosina y por la apertura de los canales de calcio dependientes de potasio (KCa), lo cual alivia la broncoconstricción en el asma (Holgate & Polosa, 2008).

c. Antagonistas de mediadores e Inhibidores de síntesis:

Los antihistamínicos H1 fueron los primeros agentes usados para tratar reacciones alérgicas. Los primeros productos eran efectivos controlando los síntomas de alergia, pero los efectos secundarios como sedación y los anticolinérgicos eran el problema. Gracias al desarrollo de fármacos de segunda generación que con las modificaciones estructurales han disminuido la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, aumentando selectividad y eficacia y reduciendo a su vez cardiotoxicidad (Del et al, 2006).

Los cisteinil-leucotrienos (CysLT) son los agonistas contráctiles más potentes del músculo liso de las vías aéreas y tienen efectos en la microvasculatura, glándula mucosa, eosinófilos y nervios por interactuar con sus receptores. Durante el proceso asmático hay incremento de los niveles de CysLTC₄, CysLTD₄ y CysLTE₄ y se han detectado en los fluidos biológicos. Los corticoides no son capaces de inhibir ni la biosíntesis ni las acciones de los CysLT, en este momento hay disponibles antagonistas del receptor de leucotrienos, que pueden ser usados como monoterapia in asma leve a moderada, pero su mayor uso es como terapia suplementaria a los corticoides inhalados (Kemp, 2003).

d. Inhibidores de Fosfodiesterasas:

La teofilina inhibe el nucleótido cíclico de las fosfodiesterasas, por lo cual evita la ruptura del anillo cíclico del monofosfato de adenosina (AMP) o de guanina (GMP) a 5'-AMP y 5'-GMP, respectivamente. La inhibición de esta enzima lleva a una acumulación de AMPc y GMPc, lo que incrementa la señal de transducción de estas vías. Los nucleótidos cíclicos de las fosfodiesterasas son miembros de una superfamilia de enzimas genéticamente distintas (Soderling and Beavo, 2000).

La teofilina se utiliza en el tratamiento de la broncoconstricción asmática, pero los efectos adversos cardíacos y en el sistema nervioso central se observan a las mismas dosis utilizadas para tratar el asma, debido a su estrecho índice terapéutico, lo que ha reducido el uso de este fármaco. También se ha propuesto que la teofilina tiene un efecto antiinflamatorio, la evidencia es débil al respecto.

e. Fármacos para asma refractaria:

Hay ciertos pacientes con asma a quienes los síntomas no se les pueden controlar adecuadamente con el tratamiento convencional. La falta de adherencia al tratamiento es una causa importante de la presencia de tolerancia, pero por otra parte el asma refractaria algunas veces responde a inmunomoduladores tales como metrotexate en dosis bajas, azatiopirina o ciclosporina. Los corticoides fallan en reducir los niveles de expresión del factor de necrosis tumoral (TNF) y otras citocinas, lo que puede explicar lo limitado de su efectividad en el tratamiento de formas severas de asma. Basado en el hecho del aumento en la expresión del TNF en las vías aéreas hay estudios clínicos evaluando el efecto de proteínas soluble de fusión del receptor de TNF o con anticuerpos monoclonales específicos (Holgate & Polosa, 2006).

1.4 Asma bronquial como proceso Inflamatorio

El asma bronquial es una enfermedad inflamatoria crónica y el papel del mastocito en la inflamación de las vías aéreas respiratorias ha sido estudiado extensamente. La evidencia de que la inflamación era un componente visto en los asmáticos fue observada en autopsias de pacientes con asma fatal. Las vías aéreas de estos sujetos mostraban infiltración de neutrófilos y eosinófilos, mastocitos degranulados, hipertrofia e hiperplasia del músculo liso bronquial (Busse & Lemanske, 2001). Por lo que los trastornos en la fisiología de las vías respiratorias y el remodelado de sus paredes, característico del asma, son consecuencias de un proceso inflamatorio (Bradding et al, 2006).

Existe el debate acerca de cual es el tipo celular más importantes, que media los cambios en las vías respiratorias en el asma, pero un análisis crítico de la evidencia que se tiene indica que no todos los elementos en las vías aéreas son disfuncionales (Bradding & Wulff, 2009b). Entre los principales elementos disfuncionales tenemos por una parte a nivel epitelial con fallas en el proceso de cicatrización y sobreproducción de factores de crecimiento y citocinas pro-inflamatorias (Holgate et al., 1999). La hiperplasia de las glándulas mucosas que se asocia a la hipersecreción de moco (Carroll et al., 2002). Disfunción del músculo liso de las vías respiratorias que resulta en hipertrofia, hiperplasia, hiperreactividad bronquial y secreción de citocinas (Ebina et al., 1990; 1993; Brightling et al., 2005) y activación de células inflamatorias con sobre-actividad de mastocitos (Bradding et al., 2006), células T (Robinson et al., 1992), eosinófilos (Bradding et al., 1994) y neutrófilos (Carroll et al., 2002).

2. Mastocito

2.1 Generalidades del mastocito en el asma

El papel del mastocito en el asma es de renovado interés debido en gran medida a publicaciones que registran el aumento de estos en el músculo liso del tracto respiratorio de pacientes asmáticos (Brown et al, 2007) sobre todo de aquellos con asma de componente alérgico. Además, el mastocito está implicado tanto en la regulación de diversos procesos homeostáticos como patológicos, y es una célula capaz de lograr esa importancia por el contenido de diferentes mediadores que tiene almacenado en sus gránulos (Bradding, 2009a).

Los mediadores liberados por el mastocito representan un evento esencial en el inicio de las respuestas inflamatorias asociada con desórdenes alérgicos (Gilfillan & Rivera, 2009). A parte de la participación del mastocito en la fase inmediata de la respuesta alérgica que lleva a un efecto local agudo con formación de edema, tumefacción del tejido o broncoconstricción, por la liberación de mediadores pro-inflamatorios y quimiotácticos, el mastocito también tiene efecto en la fase tardía de la respuesta alérgica (Nauta et al, 2008).

2.2 Biología básica del mastocito

En 1878 Paul Ehrlich descubre unas células que poseían gránulos intracelulares, y las denominó mastocitos, palabra procedente del griego "Mastos", que significa mamas, ya que consideraba que estos gránulos estaban llenos de nutrientes (Saito & Okayama, 2005). Los mastocitos son de origen hematopoyético y derivan de células pluripotenciales residentes en la médula ósea, principalmente (Kirshenbaum et al., 1991). Los precursores viajan como CD13⁺CD34⁺KIT (CD117)⁺ por la sangre. Localmente la diferenciación a mastocitos maduros depende de los diferentes factores de crecimiento y el más importante para diferenciación, crecimiento, sobrevivencia, adhesión y desgranulación es el "*Stem cell factor*" (SCF) (Galli et al., 1994), producido por células del estroma, incluyendo fibroblastos y células endoteliales (Prussin & Metcalfe, 2006). La vida media del mastocito es más prolongada comparada con otras células inflamatorias, puede sobrevivir en el tejido varios meses después, luego sufre apoptosis (Metcalfe et al., 1997), otros autores describen que es capaz de sobrevivir por años, a pesar de estar totalmente diferenciada e incluso proliferar en respuesta a señales apropiadas (Abraham & St. John, 2010).

2.3 Morfología y Distribución

El mastocito humano tiene forma ovoide o irregularmente alargado con un núcleo oval y contiene gránulos citoplasmáticos metacromáticos, con un diámetro que oscila entre los 5 a 15 μ m (**Fig. 1**). En el pulmón, los mastocitos se encuentran en el tejido conectivo de las vías aéreas bronquiales y en el espacio intra-alveolar. En la piel, los mastocitos están en gran número alrededor de los vasos sanguíneos, el folículo piloso, las glándulas sebáceas y las glándulas del sudor (Prussin & Metcalfe, 2006).

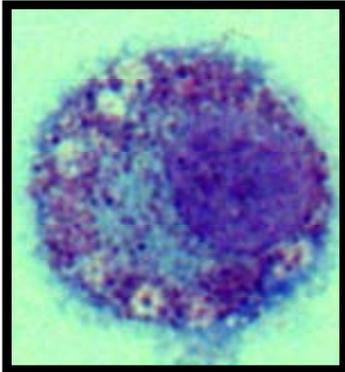


Fig 1. Imagen de un mastocito. Mastocito obtenidos de pulmón fijado con un cito-centrifugado y teñidos con May-Grunwald-Giemsa (MGG).

Normalmente, el mastocito está distribuido en todos los tejidos vascularizados, y es particularmente abundante en sitios que interactúan con el ambiente exterior como la piel, el tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio donde se suelen localizar perivascularmente; pero en estados patológicos también se encuentran en superficies epiteliales además de próximos a los vasos, nervios, en músculo liso y en el sistema nervioso central (Galli et al., 2005).

Los mastocitos están presentes en diferentes compartimentos del pulmón de individuos asmáticos, como el espacio bronquioalveolar, bajo la membrana basal, adyacente a los vasos sanguíneos, alrededor de las glándulas de la submucosa y diseminada a través de la haces del músculo liso de las vías aéreas (**Fig. 2**) (Marone et al., 2005).

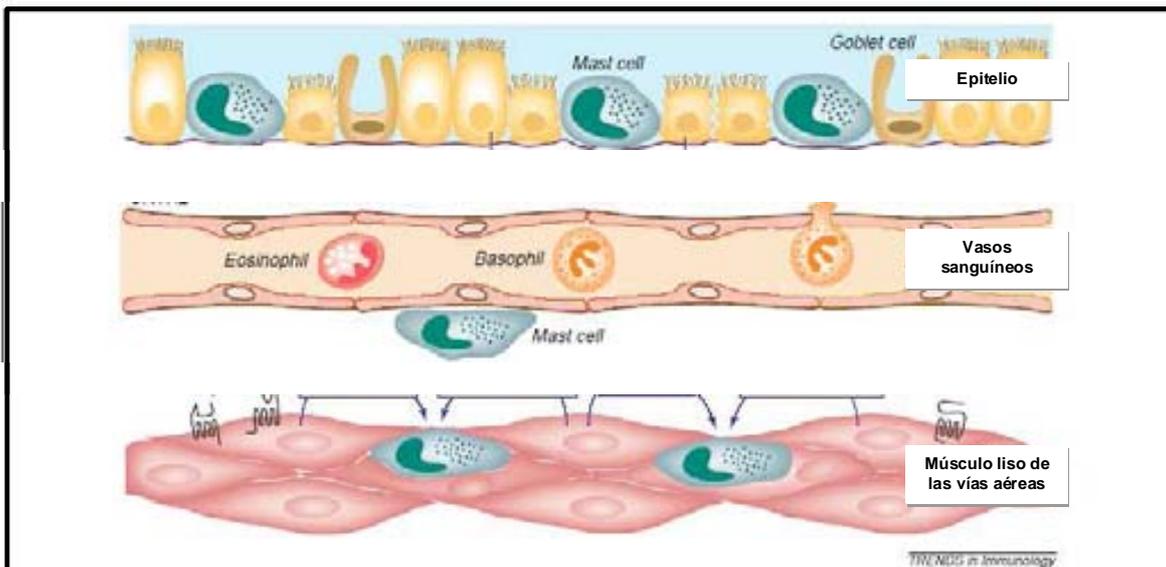


Fig. 2 Microlocalización del mastocito en el tejido pulmonar de un asmático. El mastocito está localizado asociado con el epitelio y las células goblet y bajo la membrana basal. En el músculo liso de las vías aéreas y cerca de los vasos sanguíneos. Adaptado de *Marone et al., 2005 en TRENDS in Immunology*

En el pulmón de un individuo asmático, los mastocitos migran al epitelio de las vías aéreas, a las glándulas mucosas y al músculo liso. El número de mastocitos infiltrados en el músculo liso de las vías aéreas se correlaciona significativamente con la hiperreactividad en asmáticos, implicando su importancia en la patofisiología del asma (Bradding & Brightling, 2007).

2.4 Clasificación Fenotípica

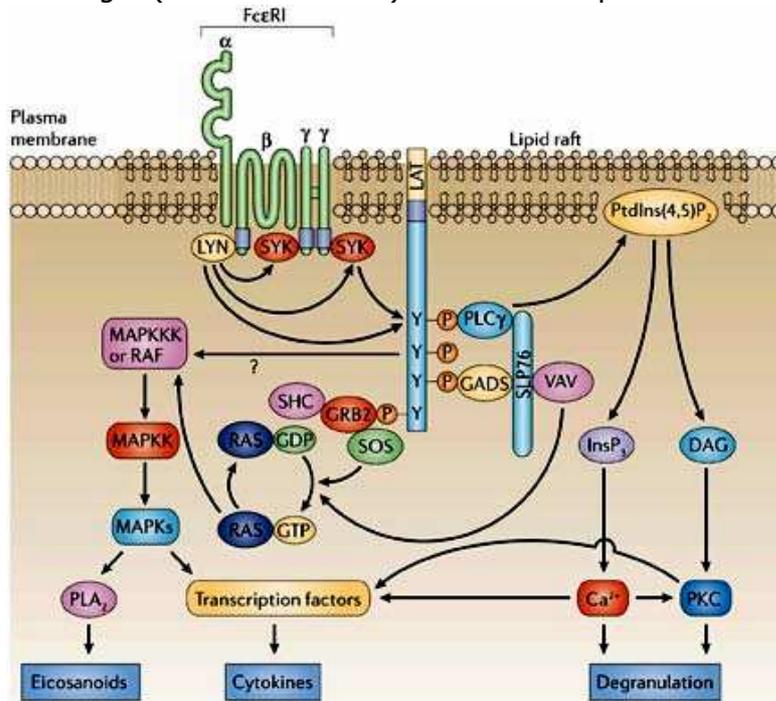
En humanos, los mastocitos se identifican en dos tipos, clasificación basada por la expresión de proteasas, una es el fenotipo positivo para la tinción a Triptasa designado con las iniciales MC_T y el fenotipo positivo para Triptasa y Quimasa, o por sus iniciales MC_{TC} . El fenotipo Triptasa-Quimasa positivo predomina en la piel y en la submucosa del intestino delgado, líquido sinovial. Otra característica del fenotipo Triptasa-Quimasa positivo es que también expresan Catepsina G y Carboxipeptidasa A (Saito & Okayama, 2005). El fenotipo Triptasa positivo lo encontramos en las vías aéreas y en la mucosa del intestino delgado, en el caso de pacientes con artritis reumatoidea, contienen la mezcla tanto del fenotipo MC_T como el MC_{TC} . Hay otro grupo de mastocito que sólo contienen Quimasa denominada MC_C están localizados en la submucosa y mucosa del estómago, submucosa del intestino delgado y en la mucosa del colon (Irani & Shwartz, 1994).

2.5 Activación del Mastocito

El mastocito puede activarse ya sea por vía inmunológica como no-inmunológica.

2.5.1 Vía Inmunológica o dependiente de IgE

En el primer caso la activación del mastocito puede iniciarse por un alérgeno vía "cross linking" (entrecruzamiento) de los receptores de alta afinidad (FcεRI) de los anticuerpos IgE en la superficie celular. El FcεRI



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

esta unido a la membrana y se une a la IgE con alta afinidad a una razón de 1:1. Este tipo de activación desencadena reacciones alérgicas agudas tales como asma aguda, reacciones anafilácticas y rinitis alérgicas (Ishizaka et al., 1984) y puede generar mediadores que participen en reacciones alérgicas tardías (Fig. 3).

Fig. 3 Activación del mastocito a través de la interacción con la Inmunoglobulina E (IgE). Adaptado de Gilfillan & Tkaczyk, 2006

Cuando se agrega el receptor FcεRI induce un cascada de eventos de señalización intracelular lo cual produce una rápida liberación de histamina y enzimas proteolíticas, como consecuencia de la desgranulación, y liberación de leucotrienos y prostaglandina, como resultado de la hidrólisis fosfolipídica de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). Seguidamente aumenta la expresión de genes, una variedad de citocinas y quimiocinas que también son liberadas luego de la activación del mastocito, desde luego estas son respuestas tardías que se observan varias horas después de la desgranulación y la liberación de los mediadores lipídicos.

2.5.2 Vía no Inmunológica

Acoplados a receptores Proteína G

En el caso de activación no inmunológica tenemos por ejemplo la observada mediante la cascada de señalización iniciada con la familia de receptores acoplados a proteína G, que es una proteína heterotrimérica (α - β - γ) unida a Guanidil Trifosfato (GTP), sensible a la toxina *pertussis*. Una vez se une un ligando endógeno o exógeno al receptor de proteína G esto permite que las subunidades $G\alpha$ se disocie del dímero $G\beta\gamma$, entonces inicia la cascada de señalización. La subunidad alfa de la proteína G ($G\alpha$) se divide en cuatro grandes grupos basado en una secuencia homologas y similitudes funcionales ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$) (Kuehn and Gilfillan, 2007) (**Fig. 4**).

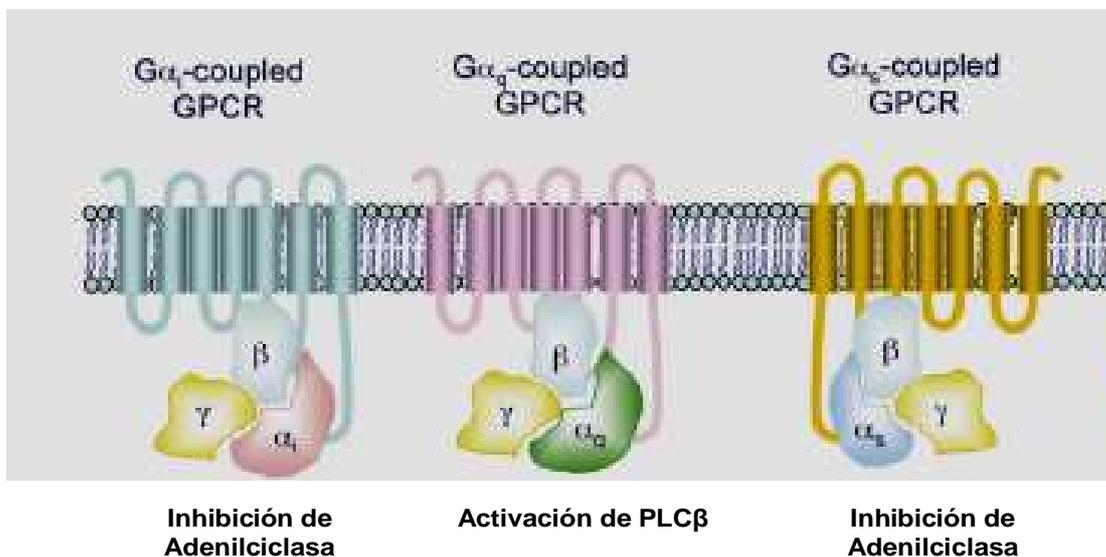


Fig. 4 Ejemplo de las clases de de receptor acoplado a Proteína G (GPCR) y la principal vía de señalización por su respectiva subunidad $G\alpha$. Adaptado de Kuehn & Gilfillan, 2007

La proteína $G\alpha_s$ estimula la adenilato ciclasa, la $G\alpha_i$ la inhibe, la $G\alpha_q$ activa la fosfolipasa C β (PLC β). El dímero disociado $G\beta\gamma$ también regula una variedad de efectores intracelulares, incluyendo la PLC β , la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), canales iónicos, y la adenilato ciclasa (Ferry et al, 2002) (**Fig. 5**).

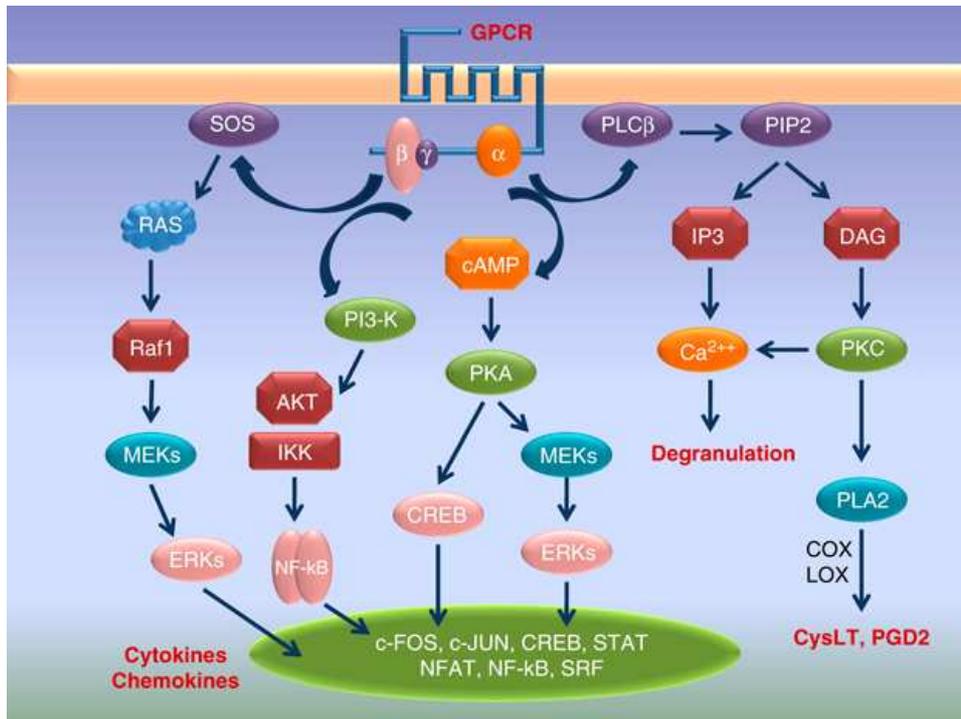


Fig. 5 Activación del mastocito a través de receptor acoplado a Proteína G (GPCR). En este esquema se detalla la activación a través de PI3-K, AMPc y PLC β , con activación de las vías de MAP quinasas, además se destacan los efectos más importantes que desencadenan la activación de estos receptores, desgranulación, síntesis de citocinas y quimiocinas, nueva síntesis de eicosanoides. Adaptado de Pundir & Kulka, 2010.

No acoplados a Proteína G

Otros estímulos no inmunológicos que pueden activar el mastocitos son los ionóforos de calcio, neuropéptidos, compuestos básicos, factores del complemento, dextranos, citosina (p.e SCF), lectinas, estrés emocional, cambios de temperaturas, medios de contraste y opiodes (Metcalf et al., 1997). En los últimos años muchos investigadores hablan sobre la activación a través de los receptores "Toll-like" (TLR) (Prussin & Metcalfe, 2006).

Es de particular interés en este trabajo la activación del mastocito a través de cambios osmóticos. Dicha activación en la célula es causada por el movimiento de agua a través de la membrana celular desde la región de baja concentración de soluto hacia la región de alta concentración de soluto para equilibrarla (Janacek et al., 2000). El incremento de la concentración de iones dentro de la célula induce activación y liberación de mediadores. En mastocitos humanos de pulmón se ha observado la activación de estos por pequeños cambios en la osmolaridad produciendo liberación de histamina *in vitro* (Eggleston et al., 1984). Las células necesitan mantener un pH citosólico constante, lo cual afecta muchos mecanismo bioquímicos intracelulares y es por lo tanto crítico para su funcionamiento. Se sabe que hay vía de transporte

sensibles al pH y al volumen, y que los cambios en el pH citosólico está acompañado con alteraciones en el volumen celular y viceversa (Grinstein et al, 1985). Las células pueden hincharse o encogerse y regresar a su volumen normal por activación del transporte iónico. El control del pH citoplasmático por el intercambiador de Na^+/H^+ parece ser una característica general no solo en células eucariotas sino también en procariontas como las bacterias (Grinstein et al, 1985) (Fig. 6). En algunas células el intercambiador de Na^+/H^+ esta quiescente y puede activarse ante un shock hiperosmótico (Cala, 1980). Esta activación lleva a la alcalinización del pH citoplasmático, un incremento intracelular de la concentración de Na^+ y a la recaptación de agua obligada osmóticamente. No se conoce completamente las vías de transducción de señal que relacionan los cambios en el volumen de la célula con la activación del intercambiador de Na^+/H^+ , pero al parecer la activación de la proteína quinasa C (PKC) y el estrés hiperosmótico resultan en un perfil similar de fosforilación, y se ha propuesto que esta quinasa pueda estar involucrada en la activación de el intercambiador de protones ante la pérdida de volumen de la célula (Grinstein et al, 1986). Los cambios en la concentración intracelular de calcio pueden activar el transportador durante la regulación de volumen, aunque también se postula que el incremento del calcio por el estrés hiperosmótico es el resultado de la activación del intercambiador de protones. Por otro lado, el intercambiador de Na^+/H^+ es una proteína unida a calmodulina, sugiriendo que las proteínas quinasa dependientes de calmodulina es una de las mayores vías de regulación de este transportador de protones (Cabado et al, 2000).

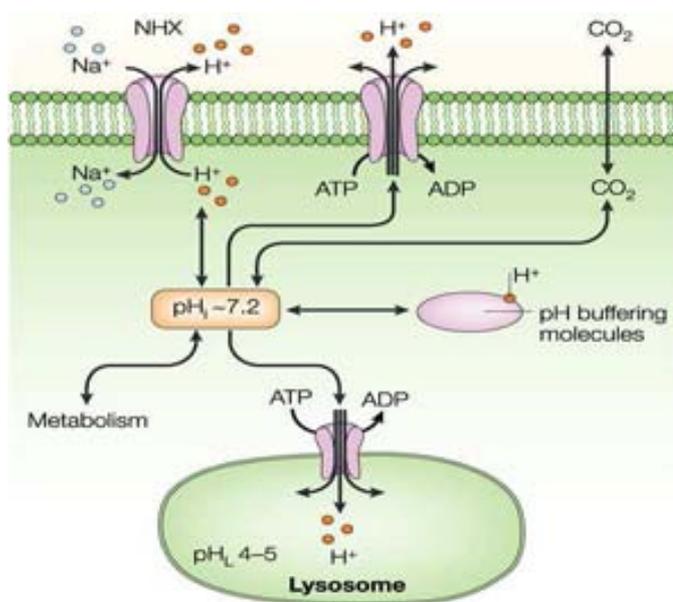


Fig. 6 La estricta regulación del pH intracelular y la concentración de protones en las organelas subcelulares es de suma importancia para el normal funcionamiento y la supervivencia de la célula. Las células regulan pasivamente su pH con un exceso de moléculas tampones. Tomado de Syntichaki & Tavernarakis, 2003

Luego de la activación del mastocito ya sea por la vía inmunológica o no inmunológica, los eventos celulares resultantes como la síntesis de citocinas, quimiocinas y eicosanoides se deben en parte a la activación de las MAP quinasas, que son enzimas que se unen de manera covalente a grupos fosfatos de la cadena latera tanto en residuos de serina, treonina o tirosina de proteínas específicas dentro de las células (Johnson and Lapadat, 2002).

Las MAP quinasas son enzimas de transducción de señales altamente conservados en eucariotas que responden al estrés del ambiente, así como a la estimulación de los receptores de la membrana plasmática, mediante el control moléculas claves hasta la maquinaria de transcripción en el núcleo. Esta familia de enzimas incluye varios subgrupos, tales como quinasas c-Jun amino-terminal (JNKs), quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y las proteínas p38, todas comparten la propiedad común de ser activado a través de una cascada de fosforilación de tres módulo, lo que les permite a su vez fosforilar una amplia gama de sustratos, incluyendo otras proteínas quinasas, fosfolipasas y factores de transcripción (Karin, 1998; Chang and Karin, 2001)

2.6 Mediadores del Mastocito

Los mastocitos ejercen sus funciones biológicas casi exclusivamente por mecanismos inmune humoral. La lista de mediadores liberados por el mastocito es enorme y explica como estas células están involucradas en diferentes funciones fisiológicas y patofisiológicas (Bischoff, 2007).

Los mediadores producidos por el mastocito suelen dividirse en los preformados, los mediadores lipídicos sintetizados de novo y las citocinas. Estas categorías no son absolutas, ya que al menos el TNF-alfa, esta preformado y es sintetizado de novo.

Los mediadores preformados están almacenados en gránulos secretores, y una vez activado el mastocito el contenido es liberado al ambiente extracelular en minutos. Los gránulos están constituidos principalmente de histamina, serinas proteasas, Carboxipeptidasa A y proteoglicanos (heparina y sulfato de condroitina E) Fig. 7.

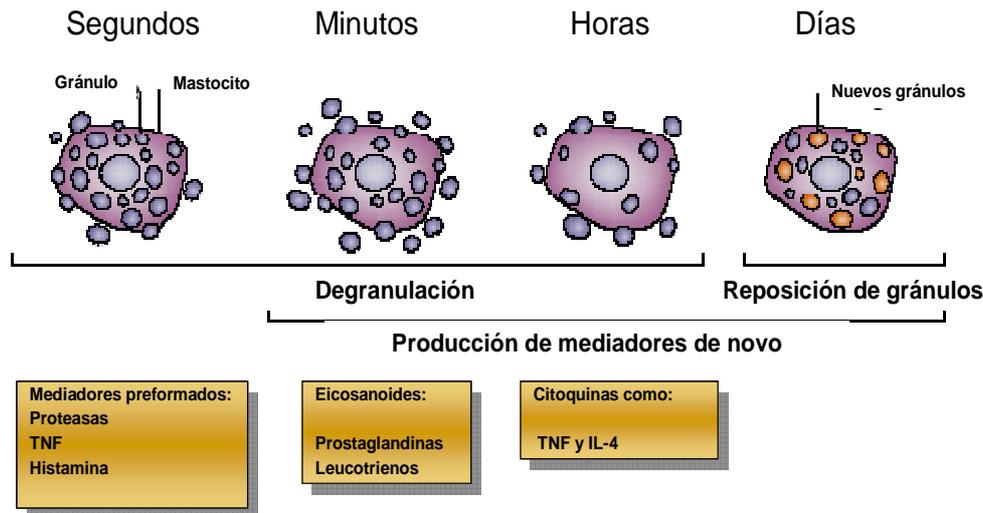


Fig. 7 Ritmo de la liberación de mediadores del mastocito luego de su activación. Adaptado de Abraham & St. John, 2010.

2.6.1 Mediadores Preformados

a. Aminas Biogenas

La histamina se forma por la descarboxilación del amino ácido histidina por medio de la enzima L-histidina descarboxilasa. El principal sitio de almacenaje de la histamina, en la mayoría de los tejidos, es el mastocito; y en la sangre es el basófilo. Estas células sintetizan histamina y la almacenan en gránulos secretores. El pH de estos gránulos secretores es aproximadamente 5.5, por lo que la histamina tiene carga positiva y forma un complejo iónico complejo con grupos ácidos con carga negativa, principalmente proteasas y heparina o proteoglicanos de sulfato de condroitina (Goodman & Gilman, 2006). En los mastocitos humanos, el mediador principal es la histamina, aunque en roedores la serotonina presenta igual importancia. La histamina ejerce sus efectos fisiológicos al unirse a receptores específicos en la membrana de las células blanco. Hay tres tipos de receptores descritos para histamina: H_1 , H_2 y H_3 y pueden distinguirse por su sensibilidad a los inhibidores farmacológicos. El efecto de la histamina es corto porque es eliminada rápidamente por un sistema de transporte específicos para aminas. Los efectos fisiológicos de histamina los presentamos en la siguiente tabla 2 al final de la sección. Es importante mencionar que los efectos de la histamina se ven potenciados por otros mediadores tales como la prostaciclina (PGI) o el óxido nítrico (NO) sintetizados en células endoteliales, previa estimulación por parte de la histamina (Abbas et al, 2007).

b. Enzimas granulares y Proteoglicanos

La mayoría de las proteínas en los gránulos contienen proteasas neutras; triptasa, quimasa y carboxipeptidasa. La triptasa es un tetrámero con un peso molecular de 110 a 130 kd con subunidades de 31 a 36 Kd que es estabilizado por su asociación con proteoglicanos. La función de la triptasa *in vivo* es desconocida, pero *in vitro* puede escindir los factores del complemento C3 y C3a, activar fibroblastos, y promover la acumulación de células inflamatorias (Prussin & Metcalfe, 2006). La quimasa ha mostrado tener influencia en el reclutamiento de neutrófilos y también en limitar los efectos dañinos de productos tóxicos derivados de procesos inflamatorios, como neurotensina y endotelina (Abraham & St. John, 2010).

En el grupo de los proteoglicanos están incluidos la heparina y el sulfato de condroitina, constituido por un núcleo de polipéptidos y cadenas laterales no ramificadas de glucosa-aminoglicanos que le imparten una fuerte carga negativa a la molécula; esta propiedad permite que se pueda almacenar en forma de matriz junto con las aminas biógenas que están cargadas positivamente, proteasas y otros mediadores y así prevenir su accesibilidad al resto de las células. Los mediadores se van liberando a diferentes velocidades luego de la exocitosis, las aminas biógenas se disocian más rápido que la triptasa o quimasa. Ser podría decir que los proteoglicanos controlan la cinética en la salida de los mediadores en reacciones de hipersensibilidad inmediata (Abbas et al, 2007).

2.6.2 Mediadores sintetizados de novo

a. Mediadores Lipídicos

En la categoría de los mediadores sintetizados de novo están los lipídicos que representan una familia de moléculas de señalización con gran impacto en inflamación y alergia. Tienen un papel fundamental tanto en el inicio como en la resolución de la reacción inflamatoria. La membrana lipídica es la que abastece el sustrato de Ácido Araquidónico (AA) necesario para la producción de eicosanoides; catalizado por la enzima Fosfolipasa A₂ (Goodman & Gilman's, 2006). El AA libre es metabolizado a su vez por dos grandes clase de enzimas las ciclo-oxigenasas (COX) y las lipo-oxigenasas (LOX); la acción de estas enzimas llevan a la producción en caso de las COX de los prostanooides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) ya las LOX convierten el AA a leucotrienos y una variedad de metabolitos hidroxilados. Los prostanooides biológicamente activos más importantes implicados en la inflamación del tracto respiratorio incluyen la prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina E₂ (PGE₂),

prostaciclina (PGI_2) y tromboxano A_2 (TxA_2) (Figura 8). La PGD_2 se produce con la activación del mastocito y se asocia con el componente alérgico del asma. En el caso de la PGE_2 , su papel en el asma destaca de los otros prostanooides ya que tiene tanto efectos benéficos como broncoprotector y anti-inflamatorio así como deletéreos por sus efectos pro-inflamatorios, que puede explicarse por el subtipo de receptor al que se une la PGE_2 (Nauta et al., 2008). Los prostanooides activan los receptores que se encuentran en la membrana celular y que están cerca de su sitio de formación. Todos los receptores para eicosanoides están acoplados a proteínas G, los cuales dependiendo del subtipo modula la actividad de adenil ciclasa y fosfolipasa C. Hasta el momento la PGE_2 tiene 4 receptores (EP 1-4) (Goodman & Gilman's, 2006). El receptor EP_3 es una excepción porque presenta splicing alternativos en el ARN mensajero que determinará el efecto fisiológico final (Narumiya et al., 1999) como se detalla más adelante en el apartado de PGE_2 y sus receptores.

La prostaciclina y los tromboxanos son prostanooides cuyos efectos biológicos tienen más relevancia en el sistema cardiovascular; pero también tienen un papel inflamatorio, la prostaciclina ha mostrado efecto de naturaleza dual como la PGE_2 , tanto pro-inflamatorio como anti-inflamatorio. Por otra parte, el TxA_2 participa en el desarrollo de la respuesta alérgica de las vías aéreas, en pacientes asmáticos los niveles de TxA_2 están elevados luego del sensibilizar con alérgenos. El mayor producto del ácido araquidónico a través de la vía de la LOX son los leucotrienos, especialmente el LTC_4 y sus productos de degradación LTD_4 y LTE_4 . El LTD_4 es producido por mastocitos de la mucosa y basófilos, pero no por los mastocitos del tejido conectivo. Los leucotrienos se unen a receptores específicos en las células del músculo liso y causan una broncoconstricción prolongada. Un tercer tipo de mediador lipídico producido por los mastocitos es el factor activador de plaquetas (PAF siglas en inglés), porque en los bioensayos producía agregación plaquetaria en conejos. El PAF tiene acciones broncoconstrictoras directas, también puede causar retracción de las células endoteliales y puede relajar el músculo liso vascular y causar vasodilatación, pero al ser destruido por hidrólisis en el plasma sus acciones biológicas son limitadas (Abbas et al, 2007).

Es importante anotar que la capacidad del mastocito de producir eicosanoides varía grandemente de un tejido a otro. Así pues, en el intestino en situaciones como parasitosis se han observado que el mastocito genera cantidades importantes de PGD_2 , cisteinil-leucotrienos (cysLTs) y LTB_4 ; pero en condiciones normales sólo genera PGD_2 cuando es activada. Otro ejemplo de esta particularidad, es la cantidad de cysLTs

generada en piel es 6 a 10 veces menos al compararlo con el útero, pulmón o intestino. Estas observaciones sugieren que la vía enzimática de las prostaglandinas parecen estar expresada constitutivamente, a diferencia de la vía de las LOX que su actividad está aumentada en condiciones de inflamación y puede ser inducida por citocinas derivada de células T y otros elementos del microambiente inflamatorio (Saito & Okayama, 2005).

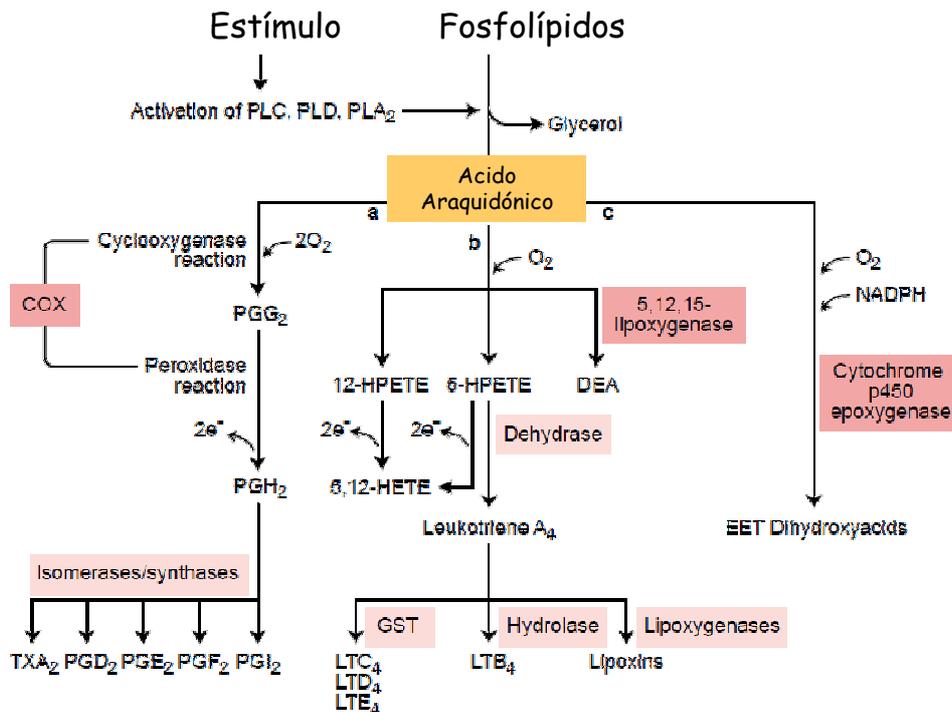


Fig. 8 Las mayores vías involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico- El AA deriva directamente del ácido linoléico o es ingerido en la dieta; se almacena en la membrana celular de casi todas las células y es liberado en respuesta a estímulos. Modificado de Belton & Fitzgerald, 2003.

a.1 PGE_2 y receptores EP

La PGE_2 no es el mayor producto del metabolismo del AA, sin embargo tiene una función en la homeostasis del mastocito. La PGE_2 es ubicua y tiene efectos múltiples y algunas veces funcionalmente opuestos, por ejemplo induce vasodilatación tanto de arterias como venas y es un compuesto proinflamatorio y regula la producción de varias citocinas, tales como el TNF α y la IL-6 (Murakami et al, 2003). Al menos tres enzimas catalizan la formación de PGE_2 a partir de su precursor universal PGH_2 . La diversidad de los efectos de PGE_2 depende del subtipo de receptor expresado al que se une. Estos receptores nombrados EP $_1$, EP $_2$, EP $_3$ y EP $_4$, está acoplados a la proteína G y están codificados por distintos genes. Los cuatro receptores tienen alta afinidad de

unión hacia PGE₂ y no están relacionados entre ellos o con otros prostanoïdes basados en la homología de los amino ácidos (Boyce J, 2007).

La estimulación con PGE₂ produce la activación de diferentes proteínas G, dependiendo del tipo de receptor EP al que se enganche (Fig. 9). Las características de cada receptor se explican a continuación.

a.1.1 Receptor EP₁

Descrito por ser constrictor del músculo liso. El ADNc de este receptor codifica para 402 amino ácidos. En estudios de ARN mensajero este receptor tiene alta expresión en riñón, seguido de la mucosa muscular gástrica y tejido adrenal. La activación de este receptor esta mediada a través de la proteína Gq, vía generación de IP₃ e incremento celular de Ca²⁺ (Naruyima et al, 1999).

Existen agonistas selectivos de este receptor, pero tienen afinidad por otros receptores; sulprostona que se une a los receptores EP_{1/3} y el iloprost que se une a EP₁/IP. También hay antagonistas que se han descrito para este receptor, utilizados para su caracterización farmacológica, el SC51089 o el SC53122 (Halliman et al, 1994).

a.1.2 Receptor EP₂

El ADNc del receptor EP₂ codifica para 358 amino ácidos. La distribución del receptor en los tejidos se ha caracterizado parcialmente y está presente de manera abundante en útero, pulmón, y bazo; exhibe bajos niveles en el riñón. El EP₂ se expresa en niveles mucho más bajos que el EP₄. Estudios funcionales sugieren que este receptor tiene un papel importante en la implantación uterina y en los bronquiolos es relajante. Entre los agonistas selectivos que activan este receptor está el butaprost y el antagonista AH23848 (Coleman et al, 1994). La activación de EP₂ lleva a un incremento de los niveles de AMPc (Regan et al, 1994), al estar acoplado a proteína Gs que estimula la actividad de adenil ciclasa (AC), a su vez se produce activación de la proteína quinasa A (PKA) que subsecuentemente fosforila al factor de transcripción CREB; en paralelo esta activación inducida por el AMPc activa las MAP quinasas, y esta vía inhibe la expresión de genes como c-Jun y JunB (Versteeg, Nijhuis et al, 2000). Es un receptor que no es susceptible a desensibilización ya que cuenta con una cola citoplasmática en el C-terminal corta.

a.1.3 Receptor EP₃

Fue identificado como un constrictor del músculo liso (Coleman et al, 1994). Este receptor es único con respecto a la familia de prostanoïdes, ya que tiene múltiples

splicing alternativos o variantes, definido por la cola citoplasmática C-terminal. Estas variantes pueden explicar las diferencias en la fosforilación del receptor, desensibilización y variación en las vías de transducción de señal. La activación de este receptor inhibe la adenilato ciclasa al activar la proteína Gi, por lo que disminuye los niveles de AMPc (Sonnenburg et al, 1990). El receptor EP₃ esta acoplada con múltiples proteínas G (Gi, Gq y Gs) (Sugimoto et al, 2007). También se ha descrito que todas las variantes se unen al agonista sulprostona. La PGE₂ ha mostrado aumentar la desgranulación y producción de citocinas mediado por FcεRI en mastocitos de ratón y ésta respuesta parece ser mediada por el receptor EP₃ (Nguyen et al, 2002), aunque Kunikata y colaboradores, usando el modelo de asma alérgica inducida por Ovoalbúmina (OVA) mostraron que la vía de señalización PGE₂-EP₃ regula de manera negativa la progresión de la inflamación alérgica (Kunikata et al, 2005).

a.1.4 Receptor EP₄

El ADNc del receptor humano codifica para 488 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 53kDa. El EP₄ se expresa más que el EP₂, encontrándolo en timo, íleo, pulmón, bazo, tejido adrenal y renal (Bastien et al, 1994). Tiene un importante efecto vasodilatador y un papel importante en regular en el cierre perinatal del ducto arterioso pulmonar. Aunque su vía de señalización es igual que el receptor EP₂, a través de la disminución de los niveles de AMPc por estar acoplado a la proteína Gs, este receptor al poseer una larga cola citoplasmática de alrededor de 156 aminoácidos con 38 residuos de serina y treonina que sirve de múltiples sitios de fosforilación, sugiriendo con esto la susceptibilidad a desensibilización por fosforilación de los agonistas (Nishigaki et al, 1996).

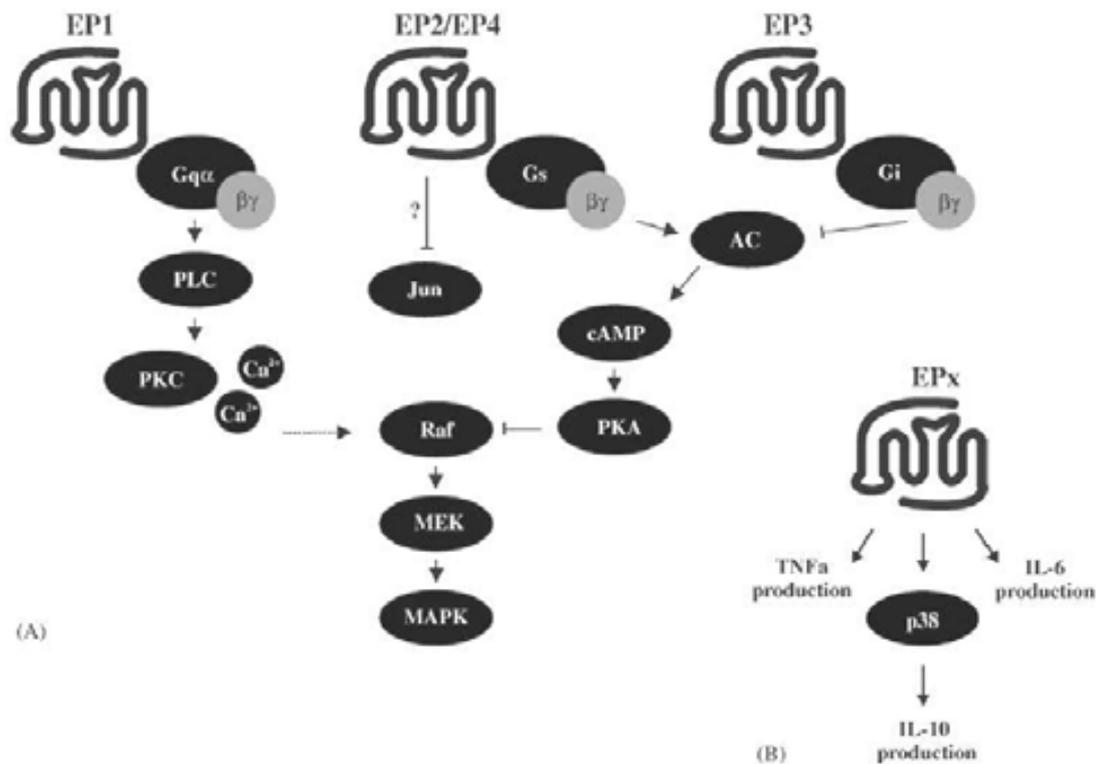


Fig. 9 Activación de los receptores de EP por PGE₂ induce diversas vías de señalización y liberación de citocinas. (A) PGE₂ se une a distintos receptores de EP en induce activación de las vías de MAP quinasa a través de Gq o Gi, o induce la regulación hacia arriba del AMPc y subsecuente activación de la PKA. (B) La exposición de ciertas células a PGE₂ resulta en la producción de citocinas como el TNFα, IL-6, y la producción de IL-10 dependiente de la MAP quinasa p38, aunque todavía no está claro que subtipo de receptor sea el responsable. (Adaptado de Bos et al, 2004)

b. Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa) que actúan mediando interacciones complejas entre células de linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Sus funciones son muy variadas: diferenciación y maduración de células del sistema inmunitario; comunicación entre células del sistema inmunitario; en algunos casos, ejercen funciones efectoras directas. Entre las propiedades generales de las citocinas tenemos

- Las citocinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica y sirven para regular las respuestas inmunitarias.
- La producción y secreción de citocinas es un hecho breve y autolimitado.
- Muchas de las citocinas no tienen un origen único, sino que están sintetizadas por múltiples tipos celulares. Dentro del sistema inmune natural, los macrófagos son las células más productoras de citocinas, mientras que en el sistema específico lo son las células T_H.

- Las citocinas son pleiotrópicas, es decir, que la misma citocina es capaz de actuar en múltiples tipos celulares.
- Las actividades funcionales de la citocinas son redundantes, es decir, que distintas citocinas pueden producir el mismo efecto.
- Las citocinas pueden influir sobre el efecto de otras citocinas: efecto antagonista (el IFN- γ bloquea el cambio de clase promovido por IL-4) o sinérgico (la acción conjunta de IL-4 e IL-5 induce en células B el cambio de clase para que produzcan IgE).
- Inician su acción tras fijarse a Rc específicos de la superficie celular: acción autocrina o paracrina.
- La expresión de muchos de los Rc de las citocinas se regulan por señales específicas. De esta forma, la respuesta a las citocinas puede ser amplificada positiva y negativamente al variar el número de Rc.
- La mayoría de las respuestas celulares a las citocinas son lentas ocurriendo en período de horas y requieren síntesis de ARNm y proteínas de novo.
- Actúan sobre muchas células regulando la división celular, bien estimulándola o inhibiéndola.
- Las citocinas "controlan" el sistema inmune: regulando (activando o inhibiendo) la activación, proliferación y diferenciación de varios tipos de células; regulando la secreción de anticuerpos y de otras citocinas (<http://epidemiologiamolecular.com/citocinas/>).

Los mastocitos producen diversas citocinas que contribuyen a la inflamación alérgica. La producción de citocinas y quimiocinas por el mastocito está estrechamente regulada y puede ocurrir independientemente de la clásica vía de activación mediada a través del FC ϵ RI. Hay alrededor de una treintena de citocinas producidas por los mastocitos humanos (Crivellato et al, 2004). Los gránulos secretores del mastocito contienen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) el cual tiene efectos proinflamatorios pleiotrópicos; ya que ha sido implicado en reclutamiento de neutrófilos y aumenta la actividad bactericida de estos, además activa la expresión de moléculas de adhesión endoteliales (ELAM-1) (Walsh et al, 1991; Kenny et al, 1993). Además, los mastocitos tienen la capacidad de generar IL-8, que contribuye al reclutamiento de neutrófilos (Moller et al, 1993). Otras citocinas encontradas en las vías áreas de pacientes normales y asmáticos están la IL-5 y la IL-6, las cuales junto con la IL-4 y la IL-13 mejoraría la respuesta inmune tipo Th2 y la quimiotaxis de eosinófilos, indicando el

papel del mastocito en el inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria en el asma (Bradding et al, 1995,; Galli, 1997).

Tabla 2. Mediadores producidos por el mastocito y sus efectos. (Modificado de Abbas et al, 2007)

Categoría del Mediador	Mediador	Función Fisiológica/Efecto Patológico
Preformados y almacenados en los gránulos citoplasmáticos	Histamina	Incrementa la permeabilidad vascular, estimula la contracción de las células del músculo liso.
	Enzimas: proteasas neutras	Degrada estructuras microbianas; daño del tejido y remodelado.
Mediadores lipídicos producidos en la activación	Prostaglandina D ₂	Vasodilatación, broncoconstricción, quimiotaxis de neutrófilos
	Leucotrienos C ₄ , D ₄ , E ₄	Broncoconstricción prolongada, secreción de mocos, incremento de la permeabilidad vascular.
	Factor activador de Plaquetas (PAF)	Quimiotaxis y activación de leucocitos, broncoconstricción, incremento de la permeabilidad vascular.
Citocinas Producidas en la Activación	IL-3	Proliferación del mastocito
	TNF, MIP-1 alfa	Inflamación en la fase tardía
	IL-4, IL-13	Producción de IgE, secreción de moco
	IL-5	Producción de eosinófilos y activación

2.7 Funciones del Mastocito:

Las funciones realizadas por el mastocito están mediadas por la gran cantidad de mediadores liberados por esta célula que se describen en el apartado anterior. Entre las funciones del mastocito encontramos:

- Regulación de funciones epiteliales (secreción y permeabilidad epitelial)
- Funciones del músculo liso (peristalsis y broncoconstricción)
- Funciones endoteliales (flujo sanguíneo, coagulación y permeabilización vascular)
- Funciones inmunitarias (regulación de la respuesta innata y adaptativa, tolerancia periférica y reclutamiento y activación de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos)
- Funciones neuronales (interacción neuroinmunes, peristalsis y dolor)
- Otras funciones (cicatrización y fibrosis) (Bischoff, 2007)

2.7.1 Funciones Inmunomoduladoras del mastocito

Los mastocitos presentan funciones inmunomoduladoras tanto positivas como negativas en las células inmunes por influir en el reclutamiento, sobrevivencia, desarrollo, así como el incremento o supresión en el inicio, magnitud y/o duración de la respuesta inmune (Galli et al, 2008).

El papel regulador del mastocito podría derivarse de la variedad de efectos biológicos que produce esta célula en la respuesta inmune, así como de las interacciones que muestran con otras células efectoras y reguladoras del sistema inmune (Frossi et al, 2010).

Debido a la distribución de la población de mastocitos en los tejidos que están expuestos al ambiente exterior, estos están en contacto directo con antígenos, patógenos y otros factores que alcanzan la superficie de las mucosas y la piel (Grimbaldeston et al., 2005).

a. Funciones inmunomoduladoras positivas

El mastocito exhibe funciones inmunomoduladoras positivas *in vivo* que puede ser mejorar la defensa del huésped o promover enfermedades, y que reflejan las acciones de sus mediadores almacenados y citocinas. Entre los ejemplos de funciones inmunomoduladoras positivas tenemos (Galli et al, 2008):

- Promover la migración, maduración, diferenciación y función de células del sistema inmune vía secreción de factores tales como el TNF, quimiocinas, histaminas, LTB₄ y proteasas
- Presentación de antígeno a células T o mejorar la presentación antigénica por captura del antígeno unido a la IgE vía FcεRI, llevándola a apoptosis
- Promover la producción de IgE por parte de las células B (mediante secreción de IL-4, IL-13 y CD40L)
- Promover el reclutamiento de células del sistema inmune por la producción de TNF y otros mediadores que regulan a la alza la expresión de moléculas de adhesión en las células del endotelio vascular.
- Promover la respuesta T_{H2} a través del efecto de PGD₂ en la maduración de células dendríticas
- Promover en el músculo liso de las vías aéreas la producción de citocinas y quimiocinas (TNF, IL-4 y la IL-13)

b. Funciones inmunomoduladoras negativas:

Las funciones inmunoreguladoras negativas del mastocito las realiza a través de la producción de IL-10 y de otros productos que limitan la magnitud y/o duración de ciertas respuestas inmune adquirida e innata, otros ejemplos de función inmunoreguladoras negativa sería (Galli et al, 2008):

- Suprimir la sensibilización en la hipersensibilidad por contacto a través de la producción de histamina inducida por los rayos ultravioleta B (UVB)
- Suprimir la producción de citocinas por células T y monocitos, vía IL-10
- Suprimir la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas por los queratinocitos, vía IL-10
- Mejorar la capacidad de las DC para reducir la proliferación de las células T y la producción de citocinas, vía IL-10

Se ha demostrado que los mastocitos juegan un papel clave como centinelas del sistema inmune en la defensa del hospedero contra parásitos, bacterias e incluso virus. En el caso de los virus, el mastocito puede activarse por diferentes proteínas del VIH-1 (gp120 y Tat) de tal manera representar una fuente potencial de citocinas Th2 durante la infección por VIH-1 (Marone et al, 2000).

2.8 Otras Patología en las que está involucrado el Mastocito

El mastocito es una célula efectora multifuncional, capaz de producir una gran variedad de mediadores tanto preformados y sintetizados de novo. Estos mediadores están envueltos en un espectro de actividades que no se confinan estrictamente a funciones inmunológicas si no también a procesos no inmunológicos. Debido a este amplio potencial que involucra una gran cantidad de reacciones, el mastocito ha ganado interés por el posible papel en otras patologías en humanos (Crivellato et al, 2004).

El mastocito es una célula clave en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide; y en otras enfermedades crónicas como la fibrosis pulmonar (Metz et al, 2007).

Se ha sugerido la participación del mastocito en procesos como el espasmo coronario, cardiomiopatía, arterioesclerosis y en isquemia cardíaca. Se ha demostrado que la quimasa escinde la angiotensina I a angiotensina II, más eficientemente que la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Church and Levi-Schaffer, 1997). En el esquema de la figura 10 a grandes rasgos se presentan los principales procesos en los que el mastocito está involucrado al igual que las citocinas que median estos efectos.

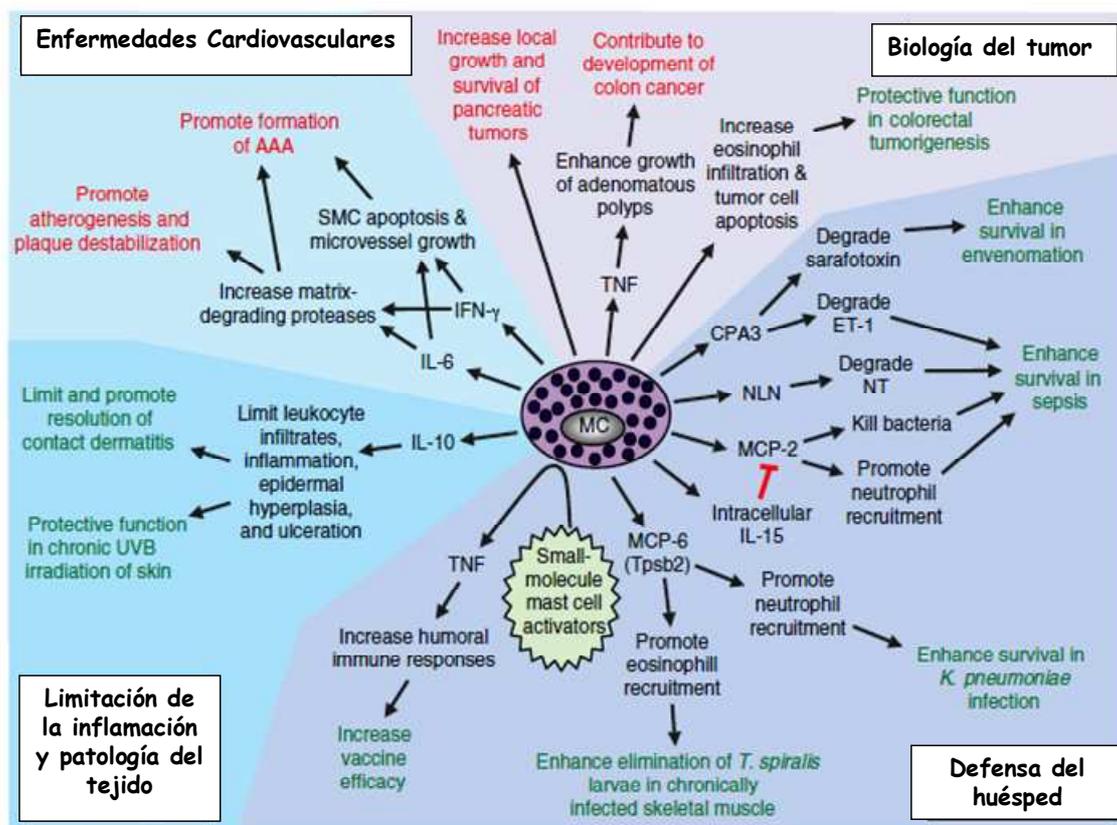


Fig. 10 Participación del mastocitos en procesos patológicos e inmunitarios. Identificados como funciones protectoras (verde) o deletéreas (rojo) del mastocito (MC) y productos del mastocito en la respuesta biológica. Aneurisma aórtico abdominal (AAA), neurolisina (NLN), neurotensina (NT), células del músculo liso (SMC). Adaptado de Kalesnikoff & Galli, 2008.

2.9 Papel del Mastocito en el asma

El mastocito en la patogénesis del asma se ha estudiado en diferentes modelos animales. Especialmente con el uso de ratones con deficiencias genéticas de mastocitos y combinándolo con protocolos de reconstitución de dichas células, lo que ha sido una herramienta muy útil para delinear por una parte el rol del mastocitos en el asma, y por otra; los receptores que expresa y los mediadores involucrados en el proceso asmático (Grimbaldeston et al, 2005).

El mastocito media la fase temprana de las reacciones de hipersensibilidad por liberación de histamina y otros mediadores, luego de la unión de la IgE al receptor de alta afinidad en caso de una reacción de tipo inmunológica o por una activación no inmunológica. Pero el proceso no termina allí, si no que sigue un proceso denominado fase tardía, y que es la causa de los síntomas recurrentes y crónicos de los individuos asmáticos (Bischoff S, 2007).

También es importante destacar que los mastocitos de pulmón han demostrado que se adhieren a las células del músculo liso de las vías aéreas, a diferencia de los eosinófilos y las células T que no lo hacen bajo las mismas condiciones. Otras evidencias de su presencia son los infiltrados de éstas células en el epitelio bronquial de asmáticos; esto permite que el mastocito incremente el acceso a los alérgenos y facilite la respuesta inflamatoria a través de la presentación de antígenos, diferenciación a respuesta T_H2 y producción de IgE. El incremento en la producción de moco que se ve favorecida por mediadores liberados por el mastocito, y es una condición característica en el asma (Bradding P, 2003).

Otras observaciones recientes es el SCF, el cual es producido por los macrófagos alveolares, y su receptor el KIT, está regulado hacia arriba en las vías aéreas de los asmáticos. Gracias a los modelos murinos de asma se han podido definir mecanismo fisiopatológicos y el protagonismo que tiene el mastocito en este padecimiento; además de la interacción de esta célula con otras, mediante la liberación de mediadores y la activación de otras células del sistema inmunológico como las células T (Brown et al, 2007).

2.9.1 Papel del Mastocito en el Remodelado de las Vías Aéreas

El asma bronquial se caracteriza por la inflamación, hiperreactividad y remodelado de las vías aéreas. El remodelado de las vías aéreas se define como un cambio estructural que puede afectar sus propiedades funcionales. Estos cambios estructurales incluyen incremento en la masa del músculo liso de las vías aéreas, hipertrofia de las glándulas

mucosas, deposición de componentes de la matriz extracelular, engrosamiento de la membrana basal reticular y angiogénesis (Busse et al, 1999). Los pacientes con asma tienen una acelerada pérdida de la función pulmonar con el paso del tiempo, y algunos pacientes desarrollan una obstrucción fija del flujo aéreo. Esta característica puede reflejar el remodelado de las vías aéreas en el asma crónica y severa. Aunque la relación entre remodelado e inflamación no se entiende totalmente, hay reportes que sugieren que el remodelado es consecuencia de la lesión repetida e inflamación persistente. Sin embargo, el proceso de remodelado comienza temprano en el desarrollo de asma y ocurre en paralelo con el establecimiento de la inflamación persistente (Phipps et al, 2004).

La hipertrofia del músculo liso de las vías aéreas y la hiperplasia son los factores más importantes relacionados con la hiperreactividad bronquial *in vitro* e *in vivo* y con la severidad del asma. Muchos mediadores inflamatorios y citocinas contribuyen a la proliferación del músculo liso de las vías aéreas y éste por sí mismo es una fuente de mediadores inflamatorios, sugiriendo una respuesta proliferativa de tipo autocrino y la interacción con células inflamatorias. Se sabe que los mastocitos son los primeros en responder ante una reacción alérgica, más cuando hay una activación vía IgE. Luego de esta activación se observa la liberación de los mediadores preformados y sintetizados de novo, como ya se ha mencionado, entre estos las citocinas. Los mastocitos tienen un papel importante tanto en la fase temprana como en las reacciones tardías de hipersensibilidad en las vías aéreas y también en el remodelado. Hay estudios que reportan la infiltración de mastocitos en el músculo liso de las vías aéreas y que está asociado con desordenes en la función en el asma (Brightling et al, 2002). Se ha encontrado que hay una gran proporción de mastocitos en el músculo liso de las vías aéreas, y que el número de mastocitos desgranulados es mayor en las personas que ha muerto por asma, igualmente se ha reportado que hay un incremento tanto de mastocitos intactos como desgranulados en las glándulas submucosa de las vías aéreas en el asma fatal y esto se asocia a cambios estructurales como el acortamiento del músculo liso y el alargamiento de las glándulas submucosa (Chen et al, 2004). Estas observaciones indican la interacción directa entre los mastocitos y las células del músculo liso de las vías aéreas, y entre el mastocito y las glándulas mucosas. De hecho, mucho de los mediadores derivados del mastocito se han reportado que están involucrados en la patogénesis del remodelado de las vías aéreas (Okayama et al, 2007) Fig. 11.

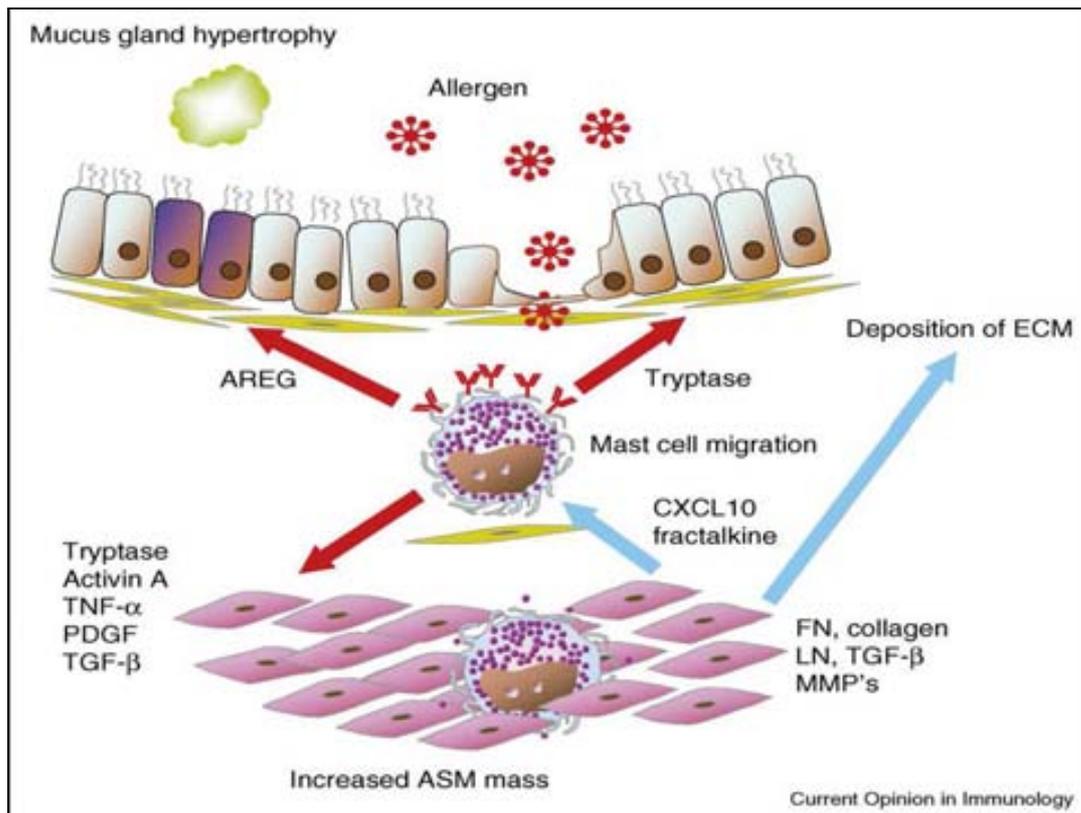


Fig. 11 Representación esquemática de la interacción del mastocito humano mediante el remodelado de las vías aéreas. Las líneas rojas indican el efecto directo del mastocito y las azules indican el efecto de las células del músculo liso mediante la activación del mastocito y el remodelado de las vías aéreas. (Adaptado de Okayama et al, 2007)

2.9.2 El Mastocito como herramienta para el estudio de asma

Por décadas se ha establecido que el mastocito es la célula clave en la inflamación alérgica. Son varias las razones entre estas la ubicación estratégica de esta célula en el cuerpo, la cantidad de mediadores que almacena y la coordinación con otras células. En el asma, si bien es cierto que hay muchas otras células y moléculas involucradas, gran parte de la farmacoterapia envuelve la inhibición o el bloqueo de sustancias producidas y/o liberadas por el mastocito; por lo que el estudio de los mecanismos de activación, síntesis, regulación y liberación que involucra a esta célula es de primordial importancia para poder optimizar por una parte el diagnóstico y por otra el tratamiento de este padecimiento, que cómo ya se ha mencionado va en aumento tanto en los países industrializados como en los en vías de desarrollo.

Para facilitar el estudio del mastocito se cuenta con herramientas como las líneas celulares o cultivos primarios, obtenidos de muestras de pacientes o modelo murino. Desde luego, estos tienen sus ventajas y desventajas que procederemos a enumerar.

Tenemos los modelos ex vivos y los modelos in Vitro. El modelo ex vivo consiste en la obtención de mastocitos maduros mediante el aislamiento a partir de tejido o mastocitos inmaduros obtenidos de progenitores ya sea de la médula ósea, cordón umbilical o sangre periférica de donantes voluntarios seguida de un proceso de diferenciación.

Para el modelo in Vitro tenemos líneas celulares inmortalizadas, ya sea humana como las HMC-1 (*Human Mast cell leukaemia cell line*) (Butterfield et al, 1988) y las LAD2 (*Laboratory Allergic Diseases cell line 2*) (Kirshenbaum et al, 2003) o murino como las RBL (*Rat Basophilic Leukaemia cell line*) (Seldin et al, 1985).

Las mayores limitaciones del uso de cultivos primarios y las líneas celulares se presentan en la tabla 3. Todas estas fuentes de mastocitos son poderosas herramientas para investigar los mecanismos por los cuales el mastocito puede influenciar en respuestas inmunológicas o biológicas in vitro. Aunque hay algunas similitudes entre los mastocitos humanos y los murinos, también están las diferencias como distribución anatómica, fenotipos y funciones que pueden influenciar en el papel del mastocitos en estas especies (Kalesnikoff & Galli, 2008).

Tabla 3. Herramientas de laboratorio para el estudio de mastocitos

(Modificado de Bischoff, 2007)

Herramienta	Humana	Murino	Limitaciones
Líneas celulares de mastocitos transformadas	HMC-1 y LAD2	RBL	Las transformaciones alteran la función normal ej. HMC-1 el c-Kit está permanentemente fosforilado.
Cultivo primario de mastocitos de progenitores	Derivado de cordón o de sangre periférica	Derivado de médula ósea	Proceso de larga duración, requiere de 6-12 semanas y la adición de coctail de citocinas.
Cultivo primario de Mastocitos de tejidos	Obtenido de piel, pulmón o intestino	Mastocitos de peritoneo. El de mucosa o piel es más difícil de obtener	Mastocito del peritoneo no tiene modelo de comparación con el humano. El aislamiento a partir de tejido depende del espécimen y la cantidad de mastocitos por gramo es limitada, además del proceso de aislamiento y las técnicas de purificación incómodas.

3. Asma Inducida por Ejercicio

El asma inducida por ejercicio (AIE) representa un síndrome caracterizado por un incremento transitorio de la resistencia y reactividad de las vías aéreas luego de 3 a 8 minutos de ejercicio intenso, que se manifiesta clínicamente por falta de aire, tos y sibilancias. Se estima que entre un 12 y 16% de la población experimenta AIE. La condición es más frecuente en niños y adolescentes que en adultos. La prevalencia de asma en atletas de alta competición ha sido estimada por estudios de provocación bronquial y/o cuestionarios entre 4,3 y 22,8% (Saranz R, 2001).

A inicios de la década de los '70, el ejercicio fue introducido como la primera prueba indirecta estandarizada de reto (activación) para uso de laboratorio, reconociendo que el ejercicio era el estímulo más común para provocar broncoconstricción y esta constricción podía ser evitada con ciertos fármacos. En el asma inducida por ejercicio se cree que los cambios osmóticos que tienen lugar en el líquido periepitelial son los responsables de la desgranulación mastocitaria (Anderson & Daviskas, 2000). Durante el ejercicio se produce aumento de la ventilación pulmonar, lo cual ocasiona pérdida de agua en las vías respiratorias que a su vez ocasiona aumento de la osmolaridad del líquido periepitelial. Al parecer estos cambios osmóticos son el desencadenante de la activación del mastocito, liberación de sus productos y el episodio de broncoconstricción; al conjunto de estos fenómenos se les conoce como la "Hipótesis Osmótica".

3.1 Hipótesis Osmótica

La hipótesis osmótica fue desarrollada desde 1982 por la observación de que sujetos con AIE lo eran también a la inhalación de solución salina hipertónica (Anderson SD, 1985). Esta hipótesis considera que la pérdida de agua por la vía respiratoria por evaporación durante el ejercicio condiciona cambios osmóticos que iniciarían los eventos que llevan a la contracción del músculo liso bronquial. El incremento de la osmolaridad crearía el medio adecuado para la liberación de mediadores de una vasta variedad de células que promueven la broncoconstricción, lo que se suma a la presencia de edema intraluminal (Fig. 12). Esto podría explicar por qué la intensidad y duración del ejercicio pueden ser importantes determinantes de la severidad del AIE. Cuanto más largo e intenso es el esfuerzo, mayor es la ventilación y mayor el número de generaciones de la vía aérea que son abarcadas por el proceso de hiperosmolaridad incluyendo una mayor superficie epitelial (Anderson & Daviskas, 2000). La liberación consecuente de mediadores, sostenida por el efecto inhibitorio de antagonistas de

histamina y receptores de leucotrienos, son rápidamente removidos por la circulación bronquial lo que ocasiona la espontánea recuperación del AIE. Estos hechos avalan que la desecación de la mucosa respiratoria que tiene lugar durante el ejercicio, puede ser un estímulo inductor de la activación del mastocito.

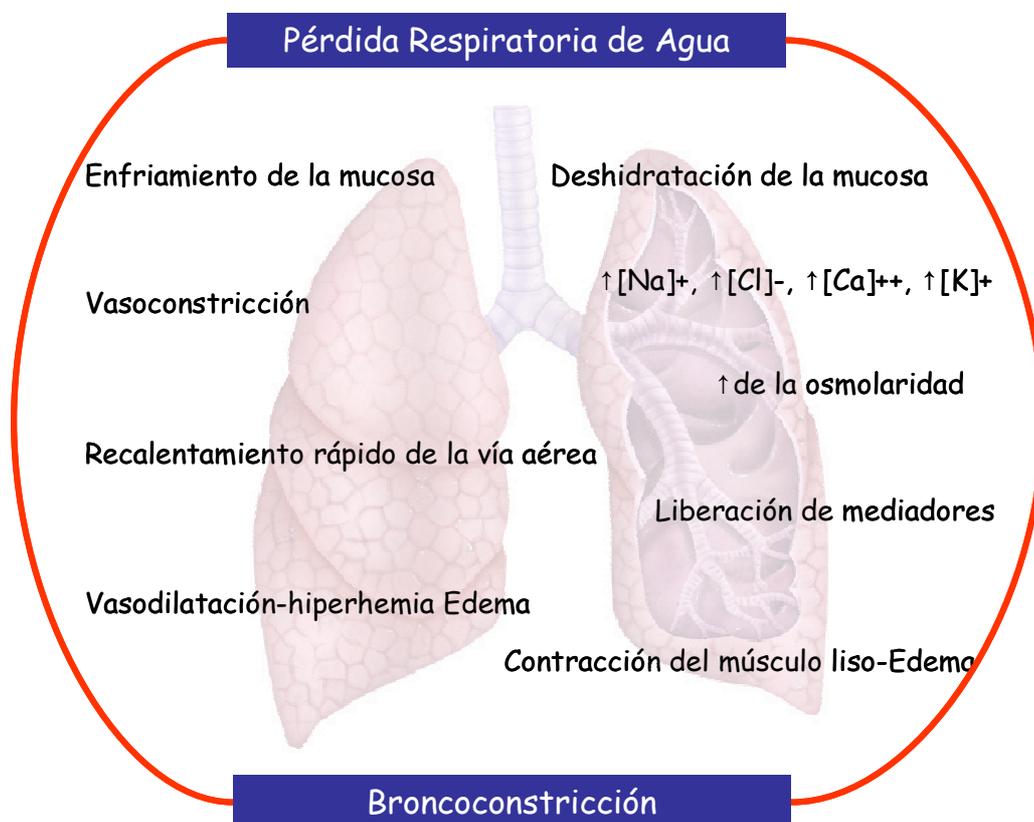


Fig. 12 Esquema de los eventos más relevantes en el asma inducido por ejercicio. De acuerdo a la hipótesis osmótica, donde el incremento en la osmolaridad induce la salida de mediadores del mastocito induciendo episodios de broncoconstricción.

3.2 Papel de la PGE₂ en el AIE

La activación del mastocito, como consecuencia de los fenómenos previamente detallados podría ser la vía final común para la broncoconstricción en AIE. Un estudio mostró un incremento significativo y simultáneo de LTB₄, PGD₂ e histamina en lavado broncoalveolar de asmáticos luego de la pruebas físicas de aumento en la ventilación (hiperventilación isocápnic) (Pliss et al, 1990). Investigaciones más recientes parecen avalar dicha hipótesis ante la observación de un incremento en orina de la 9 α , 11 β -prostaglandina F₂, principal metabolito de la PGD₂, producto de la COX derivado de los mastocitos, en los que desarrollaron AIE, tanto en niños como adultos. Existen evidencias contrastantes en cuanto a la excreción urinaria de LTE₄, producto final de la vía de los CysLTs, pero la atenuación simultánea de los niveles urinarios de ese

metabolito y de la broncoconstricción inducida por ejercicio, por el montelukast (antagonista de los receptores de leucotrienos), se halla a favor de un rol destacado de los leucotrienos en la patogenia de esta entidad clínica (O'Sullivan et al, 1998).

El rol de los mediadores inflamatorios en la patogénesis del AIE es controvertido. El ejercicio produciría la liberación de prostaglandinas inhibitorias de la bronco constricción particularmente del tipo PGE₂. Esta protección podría tener importancia para explicar el período refractario en AIE, lo que se ve reforzado por el hecho que la PGE₂ inhalada atenúa la broncoconstricción por ejercicio y la premedicación con inhibidores de la COX atenúan o eliminan la refractariedad en AIE (Melillo et al, 1994). Por otra parte, la PGE₂ ha mostrado ser una sustancia con capacidad antiasmática, de tal forma que cuando se administra previamente a la exposición de ejercicio es capaz de prevenir parcial o totalmente la broncoconstricción inducida por este estímulo. También ha reportado prevenir la respuesta broncoconstrictora inducida por alergenos en pacientes con asma de manera que atenúa o reduce la hiperreactividad y la inflamación, cuando se administra justo antes de inhalar el alergen (Gauvreau et al, 1999).

Además, en las vías aéreas de los asmáticos, la expresión génica de COX-2 esta aumentada (Stokes et al, 2002), lo que sugiere que los productos de COX estén involucrados en la patogénesis del asma. Todos estos datos soportan la hipótesis de que las Prostaglandinas juegan un papel regulador en la respuesta alérgica y el balance general es el de favorecer la supresión de la respuesta asmática por la expresión de COX-2 y de ciertos productos claves (Park & Christman, 2006). La relación de la PGE₂ y los receptores de EP en la inflamación es complicada; esta prostaglandina muestra efectos pro y antiinflamatorios, dependiendo del subtipo de receptor, población celular y el contexto de activación (Park & Christman, 2006) explicados en el apartado de PGE₂ y sus receptores. Pero en general la PGE₂ inhibe la activación del mastocito en el tracto respiratorio; al parecer esto lo hace mediante el aumento intracelular del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) en algunos subtipos de mastocitos, al suprimir la liberación de mediadores (Peachell et al, 1988), pero en mastocitos de ratones aumenta la liberación de los mismos (Goulet et al, 2004).

Por lo que el mecanismo por el cual la PGE₂ media inhibición de la activación mastocitaria aun no esta plenamente descrita; al igual que el papel de esta sustancia en la activación mediante cambios osmóticos.

En general los eicosanoides, en los que está incluida la PGE₂, se consideran potentes mediadores inflamatorios, y su inhibición podría ser un objetivo terapéutico, pero esto sería un acercamiento simple, porque existe un balance complejo entre los diferentes derivados lipídicos, por lo que es importante conocer el papel de estas sustancias en las células y en nuestro caso en particular en el mastocito como protagonista de procesos como asma y alergia. También existe poca información concerniente a la expresión de los receptores EP en los mastocitos humanos en determinados estados fisiológicos y cómo la expresión de estos receptores puede estar regulada.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

En los sujetos asmáticos el ejercicio induce broncoconstricción con liberación de mediadores. Los cambios osmóticos serían importantes causas subyacentes. Estos mismos sujetos pueden recuperarse en un período corto de tiempo, sin necesidad de medicación de rescate. En el caso de tomar de manera concomitante un analgésico antiinflamatorio no esterooidal (inhibidores de COXs) y realizar ejercicio, este periodo refractario desaparece y es entonces necesario realizar terapia de rescate del cuadro de broncoconstricción. En esta tesis se aborda el estudio de cuales son los mecanismos fisiopatológicos involucrados en esta segunda situación utilizando como modelo el mastocito, dado que es una célula principal en el proceso asmático e inflamatorio. Además se estudia como las COXs y en concreto la PGE₂ puede modular los efectos de cambios osmóticos, fenómeno que ocurre en el asma inducida por ejercicio.

Por lo que se plantea como objetivo general

“Estudiar como la PGE₂ modula los efectos mediados en la activación osmótica en el mastocito como modelo *in vitro* de asma inducida por ejercicio”

Objetivos específicos

1. Determinar las características del estímulo osmótico en el mastocito como modelo de asma inducida por ejercicio *in vitro*
2. Evaluar los posibles mecanismos que emplea el manitol para producir los cambios que el mastocito manifiesta luego de su activación
3. Modular la actividad de las ciclooxigenasas para estudiar la repercusiones del estímulo osmótico
4. Estudiar la modulación que produce PGE₂ en la activación osmótica del mastocito
5. Determinar que receptores son responsables de los efectos proinflamatorios y antiinflamatorios de la PGE₂ en el modelo osmótico
6. Evaluar la capacidad que tiene la PGE₂ de intervenir en los procesos de señalización iniciados por el manitol

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Línea celular de mastocitos humanos:

Línea celular LAD2 (*Laboratory of allergic diseases 2*): Mastocitos humanos. Condiciones de cultivo: Medio StemPro-34 Serum Free Media (SFM), complementado con StemPro-34 Nutrient Supplement, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina y 100 ng/ml de stem cell factor (SCF). El medio de cultivo es de Invitrogen Life Technologies, los demás reactivos de Lonza y el SCF es un obsequio de Amgen.

Línea celular HMC-1 (*Human Mast cell leukemia cells*): Mastocitos humanos.

Condiciones de cultivo: Medio RPMI 1640 completado, suero bovino fetal 10%, con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina. Todos los reactivos son de Lonza.

1.1 Cultivo Primario de Mastocitos provenientes de CD34+ (Rådinger et al, 2010):

Material:

Human recombinant SCF (Amgen)

Human recombinant IL-6 (PeproTech EC Ltd)

Human recombinant IL-3 (PeproTech EC Ltd)

Medio de cultivo StemPro-34 Serum Free Media (SFM), complementado con StemPro-34 Nutrient Supplement, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina

Protocolo:

Este protocolo detalla el método para diferenciar mastocitos humanos obtenidos a partir de células sanguíneas de sangre periférica de donadores sanos; provenientes del laboratorio enfermedades Alérgicas dirigido por Alasdair M. Gilfillan, Ph.D.

- Descongelar una alícuota de células CD34+ a 37oC. Tan pronto como se descongela, transferir las células a un tubo de 15 ml. Enjuagar el criotubo con medio para los mastocitos (StemPro-34) y añadir al tubo de 15ml.
- Centrifugar las células a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante por pipeteo y resuspender el pellet en 10ml de medio y transferir a dos flascones de cultivo (T175) con suficiente medio para obtener un volumen final de 30-40ml, este medio contendrá Stem Cell Factor (100 ng/ml), Interleuquina 6 (IL-6 100 ng/ml) y de Interleuquina 3 (IL-3 30 ng/ml)

- Revisar las células diariamente en el inicio del cultivo. Evitar que la densidad de las células exceda 0.5×10^6 cél/ml. Usualmente, después de 4-7 días en cultivo, los dos flascos necesitarán ser divididos en 6 flascos; para esto hay que añadir 60ml de medio (sin IL-3) a cada flascón y transferir 30ml de la suspensión de células en cada flascón adicional.
- Luego de 14 días de cultivo, 30 ml del medio de cultivo (sin IL-3) se añade a cada uno de los 6 flascos y estos se hemidepletan obteniendo un total de 12 flascos con 30 ml como volumen final. Sin embargo, esto podrá variar dependiendo de la alícuota de células de CD34+ inicial.
- En la tercera semana de cultivo, transferir las células a falcos de 50 ml y centrifugar a 1000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente. Remover la mitad del sobrenadante, resuspender el pellet de células y transferir a un nuevo flascón que contenga un volumen equivalente de medio fresco más las citoquinas SCF y IL-6 (100ng/ml, respectivamente). Esto se repite semanalmente.
- Luego de 7-8 semanas, el cultivo consiste en mastocitos humanos maduros. La pureza puede evaluarse por tinción o por análisis con citometría de flujo. Las células pueden ser utilizadas para experimentos hasta la semana 10.

1.2 Cultivo primario de mastocitos aislados a partir de pulmón

Material:

Dynal MPC®-1 Cat. No. 120-01D, Invitrogen©

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con HEPES y Glutamax (sin piruvato) Cat. No. 32430-027, Invitrogen©

Non-essential amino acids (NEAA) Cat. No. 11140-035, Invitrogen©

Horse serum heat inactivated Cat. No. 26050-070, Invitrogen©

Magnetic Beads Collection Pan Mouse IgGk kit: Detachable beads Cat No. 115.31D, , Invitrogen©

Antibiotic/antimycotic (AA) Cat. No. A5955, Sigma©

Bovine serum albumin (BSA) Cat. No. A9576, Sigma©

Collagenase Type 1A 1g Cat. No. C2674-1G, Sigma©

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) con NaHCO_2 , sin CaCl_2 o MgSO_4 , Cat. No. H9394, Sigma©

Hyalurodinasa 1g, Cat. No. H3506-1G, Sigma©

Human IL-6 20ug, Cat. No. 200-06-20ug, Peprotech©

Human IL-10 10ug, Cat. No. 200-10-10ug, Peprotech©
CD117 purified, buffered in PBS Cat. No. 555713, BD Biosciences
Tinción de Kimura

Protocolo:

Este protocolo detalla el método para diferenciar mastocitos humanos obtenidos a partir de pulmón de pacientes sometidos a cirugía torácica o de pólipos de pacientes sometidos a cirugía de otorrinolaringología, en el Hospital Clinic i Provincial de Barcelona, la técnica es una adaptación hecha a partir del protocolo seguido en el Institute for Lung Health en el Hospital de Glenfield bajo la dirección del Dr. Christopher Brightling, Leicester, Inglaterra.

Se divide dos días, el primero se recibe la muestra del tejido (pulmón o pólipo nasal), se transfiere a una campana de flujo laminar vertical, para evitar infecciones o contaminaciones.

Día 1:

- Pesar y cortar el tejido en pequeñas piezas manteniéndolo humedecido en DMEM 10% FBS.
- Una vez cortado el tejido, colocar en un embudo con una malla de 100µm y lavar dos veces con DMEM 10% FBS.
- Escurrir el tejido con la ayuda de una cuchara para eliminar sangre o mucosa en exceso.
- Nuevamente lavar dos veces más con DMEM 10% FBS.
- Llenar un contenedor con 4ml de DMEM 10% FBS, 1% NEAA, 1% A/A por gramo de tejido.
- Transferir el tejido a este contenedor con la ayuda de la cuchara, mezclar la muestra y colocarla en la nevera toda la noche.

Día 2:

- Retirar las alícuotas necesarias de las enzimas para la digestión del tejido (Colagenasa y la Hialorudinasas) a una proporción de 1ml por gramo de tejido, igualmente retirar el contenedor con el tejido suspendido en el medio completo de DMEM.
- Añadir las enzimas y con la ayuda de un magneto y colocar el contenedor en un incubador a 37°C, para que se agite por espacio de 75 minutos, chequear periódicamente que la muestra se está revolviendo apropiadamente.

- Luego de la incubación, retornar la muestra a la campana y agitar la con la ayuda de una jeringuilla de 50ml para remover el tejido conectivo que aun puede estar adherido.
- Filtrar la suspensión de células a través de una malla de 100µm, con la ayuda de un embudo y un vaso de precipitado, adicionar 10ml de DMEM 10%FBS, dos veces y descartar la malla.
- Regresar el filtrado al contenedor original con una pipeta y nuevamente se filtra, pero con la ayuda de una malla de 50 µm, descartar la malla.
- Transferir el filtrado de células en suspensión a dos falcones y aforar hasta 50ml con DMEM 10%FBS.
- Centrifugar los falcones a 1300 rpm por 8 minutos a 4oC.
- Remover el sobrenadante y resuspender el pellet en DMEM 10%FBS.
- Retirar una alícuota de HBSS/proteínas del congelador.
- Centrifugar y resuspender las células en DMEM 10%FBS, dos veces más y si el medio aún está sucio repetir nuevamente.
- Después de finalizar el paso anterior, remover el sobrenadante y resuspender en 10ml de DMEM 10%FBS y reunir los pellets de ambos falcones en uno solo.
- Tomar 5µl de la muestra de suspensión de células y poner en un ependorf de 0.5ml para realizar el primer conteo con la tinción de Kimura.
- Llenar el falcón hasta 50ml con DMEM 10%FBS y centrifugar a 1300 rpm por 8 minutos a 4oC.
- Remover el sobrenadante y resuspender en HBSS/Proteínas, incubar por 30 minutos en el cuarto frío con la ayuda del "Roller/rocker".
- Luego de la incubación, retornar las células a la campana y añadir 15ml de HBSS 2%FBS en un falcón.
- Filtrar la suspensión de células a través de una malla de 70µm, recoger el filtrado en un falcón, llenar hasta 50ml con el HBSS 2%FBS y centrifugar a 1300 rpm por 8 minutos a 4oC.

Durante la centrifugación se realiza la preparación de las Beads cubiertas con CD117:

- Poner una cantidad adecuada de beads (5 beads por 1 Mastocito) dentro de un falcón con 8 ml de HBSS 2%FBS frío.
- Colocar el falcón en el magneto (Dynal MPC®-1) por 2 minutos
- Remover el sobrenadante y sacar del magneto luego lavar con 8ml de HBSS 2%FBS y retornar el falcón al magneto, repetir estos pasos dos veces más.

Nuevamente:

- Retornar las células a la campana y retirar el sobrenadante.
- Remover el sobrenadante de las beads y añadir 1ml de HBSS/proteína a las beads y resuspender con la pipeta.
- Añadir las beads a las células y resuspender antes de colocar en un criotubo.
- Incubar las células con las beads por 90 minutos en "Roller/Rocker" en el cuarto frío.
- Luego de la incubación, transferir las células a un falcón y adicionar 12ml de HBSS 2% FBS y mezclar con la pipeta.
- Colocar las células en el magneto y luego de 5 minutos retirar el sobrenadante.
- Resuspender las beads con las células en 10ml de HBSS 2%FBS y colocar en el magneto asegurándose de romper cualquier conglomerado, repetir esto tres veces más.
- Resuspender en 4ml de DMEM 10% FBS, 1% NEAA, 1% A/A.
- Tomar 5µl de la muestra y colocar en un ependorf para la tinción con Kimera, contar las células.
- Ajustar la concentración de las células al volumen de medio de manera que:
 - Menos de 4×10^6 células colocar en 4ml de medio
 - Más de 4×10^6 células, hacer una dilución aproximada de 1×10^6 células/ml.
- Añadir 1µl de cada citoquina (IL-10, IL-6 y SCF) por cada ml de suspensión de células.

2. Análisis de la expresión de genes:

El análisis de la expresión de genes tiene como objetivo estudiar la presencia o no de una proteína determinada a nivel de su transcripción génica; en nuestro caso en particular utilizamos esta técnica para determinar y cuantificar los receptores de prostaglandina E₂ expresados en esta línea celular de mastocitos, también la síntesis de citoquinas como la IL-8 y el TNF-alfa luego de 6 horas de activación.

Extracción de ARN con RNAeasy Mini Kit[®]:

Para determinar la expresión de receptores de prostanoides y la síntesis de citoquinas como la IL-8 y TNF-alfa procedimos a obtener el ARN mensajero (ARNm) de la línea celular LAD2.

Material:

Kit de extracción de ARN: *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen).

Protocolo:

- Tomar 1x10⁶ células
- Centrifugar a 1800rpm, durante 5 minutos, a temperatura ambiente.
- Obtener el ARN siguiendo las instrucciones del kit *RNAeasy Mini Kit*.
- El ARN se mantiene estable a -80°C un máximo de 6 meses.

Retrotranscripción de ARN a cADN:

La retrotranscripción de ARNm a ADNc es necesaria para poder hacer estudios posteriores de amplificación por PCR de los genes que codifiquen para las diferentes proteínas de interés.

Material :

GeneAmp[®] RNA PCR kit, de Applied Biosystems.

Protocolo:

- Tomar 1µg de ARN y añadir agua estéril hasta tener un volumen final de 10µl.
- Añadir 10µl de la mezcla preparada con los reactivos del GeneAmp[®] RNA PCR kit. El contenido es detallado en la siguiente tabla:

Tampón de RT 10x	2µl
Mezcla de dNTPs (100mM) 25x	0.8µl
Oligonucleótidos Random de RT 10x	2µl
Transcriptasa Reversa Multiscribe [™]	1µl
Inhibidor de RNAasa	1µl
Agua libre de Nucleasas	3.2µl

- Hacer un pulso a 14000rpm, durante 11 segundos, a temperatura ambiente.
- Añadir 40µl de aceite mineral.
- Condiciones del programa de Retrotranscripción del termociclador:
 - 25°C, 10 minutos.
 - 37°C, 2 horas.
 - 85°C, 5 segundos.
 - Mantener a 4°C.

Amplificación de cADN por PCR a tiempo real:

Es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real.

Material:

LightCycler® Carrusel-Based System, de Roche

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I, de Roche

TaqMan Gene Expression Assays para IL-8 y TNF-alfa, Applied Biosystems

Protocolo LightCycler de Roche:

- Descongelar el MgCl₂, mezcla de primers, Fast Star DNA y el cADN, mantener en hielo.
- Preparar dilución 1/10 de la RT; mantener en hielo.
- Colocar los capilares sobre el bloque frío.
- Preparar la mezcla de acuerdo a la siguiente tabla:

Agua destilada	10.6µl
MgCl ₂ 25mM	2.4µl
Mezcla de Primers 5µM	2.0µl
LC-Fast Start DNA Master SYBR Green	2.0µl
UNG (1 U/µl)	1.0µl

- Mezclar la muestra suavemente con un vórtex y mantener en hielo.
- Introducir los 18µl de la mezcla a cada capilar
- Introducir 2µl del estándar o del cADN del gen de interés o agua al capilar.
- Tapar los capilares
- Hacer un pulso de centrifuga de los capilares
- Incubar los capilares 5 minutos a temperatura ambiente para la activación de la UNG.
- Los *primers* o cebadores utilizados fueron diseñados utilizando el software informático primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3>), que se presentan en la siguiente tabla:

Oligonucleótidos		Secuencia del Oligonucleótidos
β-actina	Forward	5'-GAAACTACCTTCAACTCCATC-3'
	Reverse	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGAC-3'
Receptor EP ₁	Forward	5'-TTGTCGGTATCATGGTGGTG-3'
	Reverse	5'-GGCCTCTGGTTGTGCTTAGA-3'
Receptor EP ₂	Forward	5'-GTCTGCTCCTTGCCTTTCAC-3'
	Reverse	5'-CCTCAAAGGTCAGCCTGTTT-3'
Receptor EP ₃	Forward	5'-CCACCTTTTCTTCGCCTCTG-3'
	Reverse	5'-TTTCTGCTTCTCCGTGTGTG-3'
Receptor EP ₄	Forward	5'-TCCAGCACCATTCTTCACTG-3'
	Reverse	5'-AACAAAGTGCCCAACAGGTC-3'

- Todas las reacciones fueron realizadas en duplicado. Los datos en la expresión de los receptores de EP fueron normalizados por β-actina.

Protocolo Taqman Gene expresión Assay de Applied Biosystems

- Descongelar reactivos, mantener el Gene Expression Assay protegido de la luz y en un bloque frío.
- Preparar las muestras de cDNA para adicionar 4µl a la placa fría.
- Preparar la mezcla del ensayo sobre un bloque frío con las sondas del Gene Expression Assay siguientes:
 1. β-actina-VIC probe
 2. IL-8-FAM probe Hs00174103_m1
 3. TNF-alfa –FAM probe Hs00174128_m1
- Preparadas con las siguientes concentraciones:

Reactivo	Cantidad
agua RNase-free	4
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X)	10
Taqman Control beta-actina	1
TaqMan Gene Expression Assay (20X)	1
volumen total (µl)	16,0

- Mezclar la mezcla suavemente (vortex suave) y mantener en frío.
- Introducir 16µl de la mezcla en cada pozo de la placa de 96
- Introducir 4µl del cDNA o agua según corresponda en cada pozo.
- Tapar la placa con el adhesivo
- Hacer un pulso de centrifuga a la placa
- Correr la placa en el termociclador 7900HT

3. Ensayo de liberación de Beta Hexosaminidasa en Mastocitos:

El análisis de la secreción de β -Hexosaminidasa, mediador contenido en los lisosomas celulares del mastocito, se utiliza como medida de la degranulación mastocitaria. En este caso, se va utilizar para el estudio del efecto de los diversos tratamientos tras la estimulación con el agente osmótico sobre la degranulación.

Material:

Tampón de liberación de β -Hexosaminidasa (10mM HEPES, 137mM NaCl, 2.70 mM KCl, 0.4mM NaH_2PO_4 , 5.6mM D-glucosa, 1.8mM CaCl_2 , 1.3mM MgSO_4 , 0.025% BSA, filtrar estéril).

Substrato *P-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glycopyranoside*, de Calbiochem

Tritón x-100

Tampón de citrato de sodio 0.1M (pH 4.5)

Tampón carbonato de sodio 0.2M (pH 10.7)

PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) y Ionomicina de Calbiochem

Manitol 20x (osmofundina concentrada), de B. Braun

Prostaglandina E_2

AH6809 (Antagonista receptor EP_1/EP_2), Sigma

L-826266 (Antagonista receptor EP_3), Merck Frosst

AH23848 (Antagonista receptor EP_4) Sigma

SC-560 (inhibidor selectivo COX-1), Cayman Chemical

NS-398 (inhibidor selectivo COX-2), Cayman Chemical

Aspirina (inhibidor no selectivo COX), Cayman Chemical

Protocolo:

- Separar 2×10^4 células por condición.
- Realizar dos lavados con Tampón de liberación, a 300 *g* por 5 minutos a temperatura ambiente (± 24 °C).
- Resuspender el pellet con el volumen correspondiente del Tampón de liberación para la dilución de las células.
- Separar en ependorf el volumen con el contenido de células requerido para cada condición.
- De acuerdo a las condiciones planteadas para el experimento se separa el volumen requerido se coloca en placa de 96 pocillos.
- Colocar los estímulos correspondientes PMA (50 ng/mL) más Ionomicina (2.5 μM), Manitol 10% y aforar hasta 60 μL con el tampón de liberación durante 30 minutos, a 37 °C.

- Pasado este tiempo centrifugar la placa a 300 *g* por 5 minutos, a temperatura ambiente.
- Recoger 50 μ L del sobrenadante y colocarlo en una placa de 96 pocillos. Recoger también 50 μ L del lisado celular total, que se obtiene de la adición de tritón al 1 % en el mismo tampón de liberación de β -Hexosaminidasa.
- El sobrenadante y el lisado celular total obtenido se incuban con 100 μ L del sustrato de *P-nitrofenil N-acetil-beta-D-glucosaminida* a una concentración de 1.3 mg/ml en un tampón de citrato de sodio 0.1 M (pH 4.5), durante 1 hora a 37 °C.
- Detener la reacción añadiendo 200 μ L por pocillo de un tampón de carbonato de sodio 0.2 M (pH 10.7).
- La absorbancia de *4-P-nitrophenol* es monitorizada mediante la absorbancia a 405 nm. La actividad resultante se expresa como el porcentaje de la respuesta máxima (muestras tratadas con Tritón x-100): Liberación de β -Hexosaminidasa = $OD_{\text{sobrenadante}} / (OD_{\text{sobrenadante}} + OD_{\text{Triton X-100}}) \times 100$.

4. Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite el conteo, el análisis y la separación de células que se encuentran en suspensión en un líquido. Permite hacer estudios multiparamétricos de características físicas o químicas de células individuales que fluyen a través de un aparato de detección, que capta las características de dispersión de la luz y fluorescencia que poseen estas células conformes se les hace pasar a través de un haz de luz. La dispersión de la luz varía para cada población de células analizadas: la medida de la célula dará un parámetro de dispersión, y la granularidad de la célula dará la reflexión de la luz. Además de la dispersión, el uso de los anticuerpos monoclonales marcados con moléculas fluorescentes, permite estudiar la presencia de diversos marcadores de manera simultánea.

Material:

Tampón de lavado: PBS, 2 % FCS, 0,01 % Azida Sódica. Se utiliza para lavados y resuspensión de las células.

Tampón de Fenotipado: Suero de conejo inactivado, al porcentaje deseado, en el tampón de lavado. El porcentaje del suero puede variar, generalmente entre 1-20 %; en nuestro caso lo utilizamos al 15 %. Este tampón sirve también para hacer las diluciones y las incubaciones con el anticuerpo.

Anticuerpos CD63 FITC y CD123 (IL-3R α chain) FITC, de BD Pharmingen™

4.1 Análisis de expresión de la proteína de membrana CD63:

La molécula CD63 es una proteína granular que atraviesa cuatro veces la membrana plasmática (4TM), pesa 53 kDa que se expresa no sólo en los gránulos del basófilo y en la superficie de éste cuando se activa, sino también en monocitos, macrófagos y plaquetas. La expresión de este marcador se correlaciona con la degranulación (*Knol et al., 1991*). El análisis de esta proteína se hace para estudios comparativos de los niveles de expresión antes y después de la activación celular, con fines diagnósticos, pero en nuestro caso lo hacemos con los siguientes estímulos manitol 10% (estímulo osmótico) o con PMA+Ionomicina (control positivo), comparándolo con el CD123 (control negativo) o *anti* Receptor de Interleucina 3 α de baja afinidad (*anti* IL-3R α), y con células sin estimular.

Protocolo:

- Tomar entre 0.2×10^6 - 1×10^6 células y pasar a un tubo de FACS (*Fluorescence Analyzer Cell Sorter*).
- Lavar las células con el tampón de lavado.
- Recoger las células con tampón de fenotipado (frío), lavar y resuspender en un volumen final de 100 μ L.
- En frío adicionar 5 μ L de CD63 (marcado con fluoresceína)
- Incubar en hielo por 30 minutos (evitando internalización del receptor)
- Lavar con el tampón de fenotipado, dos veces
- Resuspender en un volumen final de 300 μ L.
- Leer las muestras en el citómetro. El fluorocromo usado en este caso es FITC (fluoresceína) que se lee en el canal FL-1.

5. Estudios de Reorganización del Citoesqueleto por incorporación de Faloidina.

El citoesqueleto está constituido por tres tipos de biopolímeros; microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina o microfilamentos; junto con estos biopolímeros existe un grupo de proteínas involucradas en el control y regulación de su dinámica de polimerización/despolimerización. El citoesqueleto de actina está constituido por microfilamentos y es regulado por proteínas relacionadas o de unión a actina globular (G-actina) o filamentosa (F-actina). Los microfilamentos participan en el movimiento celular proporcionando una fuerza de locomoción resultante del fenómeno de polimerización de actina; y por otra parte, contribuyen al transporte intracelular por los que viajan moléculas y estructuras membranosas (tesis Egea).

Los cambios del citoesqueleto de actina pueden modificarse mediante el uso de sustancias naturales denominadas toxinas de actina. Entre estas se encuentran las que estabilizan la F-actina, y el compuesto más conocido es la faloidina, tóxico derivado de la *Amanita phalloides*, que se une con alta afinidad a la actina polimerizada (Actina F); por lo que convierte a la faloidina en un buen marcador de reorganización del citoesqueleto en células previamente fijadas y permeabilizadas.

Estudios de Reorganización del citoesqueleto por microscopía de fluorescencia:

Todo el procedimiento de preparación de las muestras se realiza a temperatura ambiente.

Material:

- Paraformaldehído al 4%
- Polilisina 1%
- PBS
- BSA
- Saponina
- Faloidina-TRICT
- Hoechst 33258
- Medio de montaje Prolong[®] Gold antifade reagent Invitrogen[®]
- Fluo-4/AM, de Molecular Probes
- Zeiss AXIO Observer Z.1 inverted microscope (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Germany)
- Explora Nova Fluo'Up software (Explora Nova, La Rochelle, France)

Protocolo

- El día anterior en una placa de 24 pocillos colocar los cubreobjetos estériles a lo que se le añaden 0.5-1 ml de polilisina dejándolo toda la noche a temperatura ambiente.
- El día del experimento retirar el exceso de polilisina y lavar suavemente con PBS los pocillos.
- Tomar 0.1×10^6 células por condición y activar con los estímulos correspondientes, como se explica para el ensayo de betahexosaminidasa.
- Detener la activación con un pulso de centrifuga, decantar y lavar las células con PBS y colocar en la células en cada pocillo.
- Fijar con 300 μ l de paraformaldehído 4% durante 30 minutos .
- Retirar el exceso de paraformaldehído y lavar con PBS.
- Permeabilizar con 300 μ l saponina (1%) en PBS durante 15 minutos.
- Retirar el exceso de saponina y lavar con PBS.
- Bloquear con 300 μ l de BSA (1%) en PBS durante 30 minutos.
- Retirar el exceso de BSA y lavar con PBS.
- Incubar con Faloidina-TRICT a una dilución (1/5000) en BSA (0.1%) en PBS durante 20 minutos.
- Retirar el exceso de Faloidina-TRICT y repetir el lavado con PBS tres veces.
- Incubar con Hoechst 33258 a una concentración 0.5 μ g/ml por 10 minutos.
- Retirar el exceso de Hoechst 33258 y lavar con PBS.
- Montar los cubreobjetos con 6 μ l del medio de montaje de manera que las células queden confrontadas con el portaobjeto. Evitar las burbujas.
- Almacenar cubiertos a 4°C o analizar las muestras en el microscopio de fluorescencia Zeiss AXIO Observer Z.1 inverted microscope (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Germany)

Estudio de Reorganización del citoesqueleto por citometría de flujo:

Todo el procedimiento de preparación de las muestras para el citómetro se realiza en hielo.

Material:

Paraformaldehído 4%

Saponina diluida en PBS 1%

Faloidina-TRICT

BSA diluido en PBS 1%

Tampón de lavado

Protocolo

- Tomar 0.1×10^6 células por cada punto de activación.
- Activar las células con el estímulo correspondiente, como en el ensayo de betahexosaminidasa.
- Detener la activación con un pulso de centrifuga a 14000 rpm, durante 11 segundos a 4°C.
- Fijar con 500µl de paraformaldehído 4%, durante 10 minutos.
- Lavar con PBS como se explica en el paso 3, repetir 3 veces.
- Permeabilizar con 500µl saponina (1%) en PBS durante 15 minutos.
- Lavar con PBS como se explica en el paso 3, una sola vez.
- Bloquear con 1ml de BSA 1%) en PBS, durante 40 minutos.
- Lavar con PBS como se explica en el paso 3.
- Incubar con 100µl de Faloidina-TRICT a una dilución 1/5000 durante 20 minutos.
- Lavar con PBS como se explica en el paso 3.
- Pasar las muestras a tubos de FACS y lavar con tampón de lavado.
- Centrifugar a 1500rpm durante 5 minutos a 4°C.
- Resuspender el pellet celular en 0.2-0.5 ml de tampón de lavado.
- Leer las muestras en el citometro. La emisión del fluorocromo TRICT (*Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate*), en el que se encuentra conjugada la Faloidina se lee en el canal FL-2.

6. Ensayo de actividad de ERK, P38, JNK y AKT y expresión de receptores EP

Para estudiar la actividad de MAPK como ERK, P38 y JNK y de otras proteínas, como AKT, se analiza generalmente el grado de fosforilación. En este ensayo se trabaja con lisados de células totales. Para determinar mediante western blot la presencia de receptores de prostanoïdes también utilizamos los lisados de las células.

Material

Tampón de lisis: Tritón 1 %, 50 mM Tris-base (pH 7.4), 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*), 1mM Na-Pirofosfato.

Tampón de carga (3X): 200 mM Tris pH 8.6; 6 % SDS, 0.06 % Bromophenol, 5 % 2-β-Mercaptoetanol, 30 % Glicerol

Anticuerpos anti-ERK fosforilado i anti-P38 fosforilada de Cell Signaling Technologies

Anticuerpos anti-AKT fosforilado de Santa Cruz

Anticuerpo policlonal Receptor EP₁, EP₂ y EP₃, Cayman Chemicals

Anticuerpo policlonal Receptor EP₄, Abcam

COX-1

COX-2

Protocolo:

- Contar las células y asegurarse de colocar 0.5x 10⁶ células por condición
- Lavar y resuspender en el Tampón de liberación y obtener en un volumen de 500µL en sendos ependorf las células necesarias.
- Activar las células con los distintos tratamientos y colocar en una placa térmica a 37°C, en el caso de los receptores de EP no es necesaria la activación.
- Parar activación con 500µL PBS frío, centrifugar a 4°C a velocidad máxima, decantar el sobrenadante.
- Lisar las células con 50-100µL de tampón de lisis, resuspendiendo el pellet, luego de un vórtex se mantiene en hielo por 20 minutos.
- Centrifugar a velocidad máxima por 20 minutos a 4°C.
- Recoger sobrenadante y añadir 20-50µL tampón reductor.
- Hervir las muestras a 100°C por 10 minutos para desnaturalizar.
- Las muestras están preparadas para correr en un gel de SDS-PAGE 10 %.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE):

La técnica SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamida Gel Electrophoresis*) consiste en la electroforesis de proteínas en un gel de acrilamida. Con esta técnica se consigue que las proteínas migren en función de su medida, ya que gracias a la acción del detergente SDS, todas las proteínas adquieren carga negativa en proporción de su masa, obteniendo que la relación carga/masa sea idéntica en todo los casos, y por lo tanto la migración dependa únicamente de la longitud de la cadena polipeptídica.

Esta técnica requiere la preparación de dos fases del gel de acrilamida: la fase correspondiente al gel apilador, y la fase correspondiente al gel separador. Ambas fases varían en el porcentaje de acrilamida, el pH y la molaridad. La finalidad del gel apilador es obtener el empaquetamiento correcto de las muestras, previo a la entrada al gel separador. En el gel separador tiene lugar la fase resolutive, las muestras se separan en función del peso molecular. El porcentaje de acrilamida del gel separador puede variar según los pesos de las proteínas a separar. El porcentajes acrilamida utilizado en los geles es inversamente proporcional al peso de las proteínas, es decir porcentajes de acrilamida elevados es para proteínas de bajo peso molecular, y porcentajes bajos de acrilamida es para las de alto peso molecular.

Material:

Acrilamida 30 %

Tris-Base 1M pH 8.8 y pH 6.8

SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10 %

APS (Ammonium Persulfate) 20 %

TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamida)

Tampón de electroforesis 10x, pH 8.4, 1 L: 30 g Tris-Base, 144 g Glicina y 10 g SDS).

Se trabaja al 1x.

Protocolo:

- Preparar las dos fases del gel de acrilamida. Las cantidades de cada reactivo para la preparación de ambas fases del gel están resumidas en la siguiente tabla:

	<i>Gel Apilador (10mL)</i>	<i>Gel Separador (30mL)</i>
Archilamida/Bis-Acrilamida 30%	1.5 mL	8 %-15 %
Tris-Base 1M, pH 8.8	-	11.20 mL
Tris-Base 1M, pH6.8	1.25 mL	-
Agua Mili Q	7 mL	Varía según el % de acrilamida
SDS 10%	100 μ L	300 μ L
APS 20%	50 μ L	150 μ L
TEMED	10 μ L	20 μ L

- Cargar las muestras en los pozos.
- Correr el gel aplicando un amperaje no mayor de 60 mA desde el polo negativo al positivo.

Western-Blot:

La técnica de Western-Blot consiste en la transferencia del gel de electroforesis a una membrana, que originalmente era de nitrocelulosa, aunque actualmente se utilizan más las membranas de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*). La membrana permite diversas incubaciones con los anticuerpos de interés.

Material:

Tampón de transferencia: 25mM Tris-Base, 129mM Glicina, 20% Metanol. Este tampón se mantiene a 4°C.

Tampón TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween 20*) 10x, 1 L: 24 g Tris-Base, 80 g NaCl, 20mL Tween 20. Se trabaja al 1x y se utiliza para hacer los lavados e incubar los anticuerpos.

Tampón de *stripping*, pH 2-3, 1 L: 8.75g NaCl, 1.57g Trizma. El tratamiento de la membrana con este tampón durante un tiempo de 10-15 minutos con agitación vigorosa, permite disociar los anticuerpos unidos a la membrana (debido a la acidez del pH del tampón de *stripping*). De ésta manera, la membrana se puede volver a bloquear y reutilizar para más incubaciones con otros anticuerpos.

Membrana de PVDF, de Millipore

Películas Curix RP2 Plus, de AGFA

Protocolo:

Preparar la transferencia con el gel de electroforesis: el gel en contacto con la membrana de nitrocelulosa (PVDF) y esta en contacto con un polo positivos (la transferencia se realiza del polo negativo al polo positivo). Hay diversos sistemas para realizar la transferencia: húmedo, semi-seco y seco. En el sistema semi-seco, no se excede de los 25 voltios y 3mA por cm^2 , en el caso de geles grandes; o 5.5mA por cm^2 en el caso de geles pequeños. Generalmente se utiliza un amperaje de 0.8mA por cm^2 para geles grandes.

Una vez finalizada la transferencia, se descarta el gel y se incuba la membrana con el anticuerpo de interés, siguiendo estos pasos:

- Bloquear con leche desnatada 2% o albúmina (BSA: *Bovine Serum albumin*) 2% (en caso de utilizar anticuerpos contra tirosinas fosforiladas), durante 1 hora en agitación moderada a temperatura ambiente.
- Lavar 2 a 3 veces con el tampón TBS-T, durante 5 minutos en agitación, a temperatura ambiente.
- Incubar con el anticuerpo primario, durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente, o bien durante toda la noche a 4°C en agitación.
- Lavar 2 a 3 veces con el tampón TBS-T, durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- Incubar los anticuerpos secundarios, durante 30-45 minutos en agitación, a temperatura ambiente. En el caso que el anticuerpo primario esté directamente conjugado a peroxidasa, éste paso se elimina.
- Lavar 2 a 3 veces con TBS-T, durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- Revelar con el *Supersignal Chemiluminescence substrate*, utilizando películas Curix RP2 Plus para el revelador CURIX AGFA 60.

Cuantificación de los geles de western blot

Los filmes se escanean y la intensidad relativa de las bandas son digitalizadas y analizadas usando el programa Multi Gauge Fujifilm©

7. Silenciamiento de ciclooxigenasas mediante el uso de ARN de interferencia (siRNA) usando el kit Hiperfect transfection reagent de Qiagen

La interferencia por RNA es una herramienta molecular para silenciar genes a nivel post-transcripcional. Es utilizada para la búsqueda de las funciones asociadas a varios genes mediante, genómica reversa y como herramienta terapéutica para reducir o bloquear la expresión de genes alterados o sobre expresados, en terapia genética. La interferencia por RNA proporciona una estrategia fácil y rápida para degradar los RNA mensajeros mediante la introducción de un RNA pequeño de doble cadena homólogo (siRNA) al RNA mensajero celular de interés, removiéndolo de una manera secuencia específica. Esta técnica se utiliza para silenciar los genes de ciclooxigenasas 1 y 2.

Materiales

Agua estéril libre de RNAasa

Hiperfect®Qiagen

AllStars Neg. siRNA AF488 (20nmol)

Oligonucleótidos		Secuencia del Oligonucleótidos
HP GenomeWide siRNA	Sense strand	5'-UACCGCAACCGCAUUGCCATT-3'
Hs_PTGS1_6 AF 488(20nmol)	Antisense strand	5'-UGGCAAUGCGGUUGCGGUATT-3'
HP GenomeWide siRNA	Sense strand	5'-CACCGGAAUUUUUGACAAGTT-3'
HS_PTGS2_5 AF 647(20nmol)	Antisense strand	5'-CUUGUCAAAAAUCCGGUGTT-3'

Protocolo

1. Día antes de la transfección colocar 2.5×10^5 cel/ml por pocillo en un volumen final de 2000ul en el medio de cultivo StemPro 34.
2. Preparación del complejo de transfección: resuspender los liofilizados de los siRNA, que están a una concentración de $20 \mu\text{M}$, tomar $35 \mu\text{l}$ y adicionar $100 \mu\text{l}$ del medio de cultivo y $18 \mu\text{l}$ de HiPerFect, mezclar y hacer un vórtex.
3. Incubar las muestra por 5-10 min a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo de transfección.
4. Añadir gota a gota a las células. Agitar suavemente para asegurar la distribución uniforme del complejo de transfección.
5. Incubar las células con el complejo de transfección bajo condiciones normales de crecimiento y dividir los grupos de tratamiento en
 - Grupo control sin siRNA
 - Grupo scramble (secuencia al azar de siRNA con una sonda Alexa 488)
 - Grupo siRNA COX-1 (silenciamos el gen de COX-1 con una sonda Alexa 488)
 - Grupo siRNA COX-2 (silenciamos el gen COX-2 con una sonda Alexa 647)
6. Monitorizar si el gen se ha silenciado apropiadamente en el tiempo; para este propósito, luego de varias horas tomar una alícuota de células de cada grupo de tratamiento y pasar por el citómetro.
7. Transcurridas las 48 o más horas del silenciamiento, realizar el lisado de las células para realizar el western blot y verificar el silenciamiento de los genes con anticuerpos para COX-1, COX-2 y β -actina, como carga total.

8. Determinación de calcio por fluorimetría

El calcio (Ca^{2+}) es un elemento abundante presenta ya sea en forma libre o unida a proteínas y es esencial para varios procesos bioquímicos tanto en células eucariotas como procariontas. Hace más de 100 años Ringer y Locke demostraron el papel del Ca^{2+} en la activación de las células. En los seres vivos el Ca^{2+} se considera que existe en tres formas: libre, unido o atrapado (en forma mineral con fosfatos). Una herramienta útil desde principios del siglo XX, es la medición de los cambios en la concentración de calcio, ya sea extracelular o intracelular, mediante el uso de sondas, entre estos los indicadores fluorescentes como el FLUO-4 que es un análogo del FLUO-3, introducido en 1989.

Las mediciones se realizan en el fluorímetro Modulus™ II Microplate Multimode Reader, Turner Biosystems.

Material:

Fluo 4/AM, Molecular Probe, Invitrogen® 1mg/ml

Tampón de liberación

Manitol 20% (envasado)

Ionomicina (200µg/mL)

Modulus™ II Microplate Multimode Reader, Turner Biosystems.

Protocolo

- Lavar y resuspender 0.2×10^6 (células por condición) con tampón de liberación utilizado en los ensayos de beta-hexosaminidasa, centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos. Repetir 2 veces
- Colocar el fluorocromo (Fluo 4 AM) en un rango de 1-5µM
- Incubar por 30-40 minutos a 37°C protegido de la luz
- Hacer un pulso de centrifuga y lavar con tampón de liberación, repetir 2 veces
- Resuspender las células en 600µl de tampón de liberación por condición y colocar 200µl por pocillo (triplicado de cada condición)
- Mantener la placa a temperatura ambiente y protegida de la luz
- Hacer lectura en el fluorímetro a 37°C, primero en condiciones basales en un ciclo de 1 minuto
- Colocar los estímulos y hacer 10 ciclos de 1 minuto
- Añadir 2µl de Ionomicina a todos los pocillos y hacer lectura de 5 ciclos de 1 minutos.

9. Determinación de la producción de Prostaglandina E₂ mediante un ensayo Inmuno enzimático

La Prostaglandina E₂ (PGE₂) es el producto primario del metabolismo del ácido Araquidónico (AA) en muchas células. Como la mayoría de los eicosanoides, no existe en forma preformada, Cuando las células son activadas, la PGE₂ es sintetizada de novo y liberada al espacio extracelular. In vivo, la PGE₂ es rápidamente convertida a un metabolito inactivo (13,14-dihidro15-ceto PGE₂) por la prostaglandina-15 deshidrogenasa. La vida media de la PGE₂ en la circulación sistémica es aproximadamente 30 segundos, por esta razón la determinación in vivo de la biosíntesis de PGE₂ se mide por medio de los metabolitos de ésta. El principio de este ensayo es convertir el mayor metabolito de PGE₂ en uno estable el cual es medido fácilmente por este ensayo.

Material:

Prostaglandin E₂ EIA kit-Monoclonal, Cayman Catalogo No. 514010

Tampón de EIA

Estándar de PGE₂ (reconstituir y hacer diluciones desde 1000pg/ml (tubo #1) hasta 7.8 pg/ml (tubo #8))

PGE₂ AChE Tracer

Anticuerpo monoclonal de PGE₂

Reactivo de Ellman

Protocolo

Día 1:

- Adición de los reactivos del tampón de EIA

Adicionar 100µl del tampón de EIA al pozo de unión no-específica (NSB)

Adicionar 50µl del tampón de EIA a los platos de máxima unión (B₀)

- Estándar de PGE₂

Adicionar 50µl de cada una de las diluciones desde la menos concentrada a la más concentrada por duplicado en el plato de 96 pozos.

- Muestra

Adicionar 50µl de la muestra al plato

- PGE₂ AChE Tracer

Adicionar 50µl a cada plato excepto a los pozos de actividad total (TA) o al Blanco (Blk).

- Anticuerpo Monoclonal de PGE₂

Adicionar 50µl a todos los pozos del plato excepto a los pozos NSB, TA, Blk.

Incubar el plato por 18 horas a 40C

Día 2:

Vaciar el plato de 96 pozos y lavar 5 veces con el tampón de lavado

Adicionar 200µl del reactivo de *Ellman* a cada pozo

Adicionar 5µl del *Tracer* al pozo de TA.

Cubrir el plato con una tapa plástica. El desarrollo del color se logra mejor con agitación orbital en la oscuridad alrededor de 60-90 minutos.

Leer el plato a una longitud de onda entre 405-420nm

Análisis Estadístico:

Los datos son expresados como el promedio ± error estándar de al menos tres experimentos hechos por triplicados en el caso de los ensayos de β-hexosaminidasa, flujo de calcio y ELISAS. Los resultados de los western blot son expresados como el *increase fold* en relación carga total. La RT-PCR realizadas con el sistema de Applied Biosystems fueron analizadas con el programa RQ Manager usando el método de cuantificación relativa el análisis de los datos en completamente automatizado.

Las diferencias entre los grupos de tratamientos fueron determinados con la prueba *t* de "Student", con valores de P menores de 0,05 se consideraban significativos. Los analisis estadísticos fueron realizados con el programa *GraphPad Prism 5©*.

RESULTADOS

A. Influencia de los cambios osmóticos en el mastocito humano

A.1 Elección del Agente Osmótico:

En un ambiente hipertónico, las células experimentan un cambio en la isotonicidad que produce el movimiento de electrolitos a través de la membrana celular. En el caso de los mastocitos estos cambios en la osmolaridad producen liberación del contenido granular. En condiciones fisiológicas, algo similar le ocurre al paciente asmático durante el ejercicio, la velocidad de ventilación incrementa, por lo que el tracto respiratorio requiere un mayor volumen de aire en menos tiempo, esto causa deshidratación de las vías aéreas y la subsiguiente hiperosmolaridad del ambiente; lo que genera la liberación de mediadores, a este fenómeno se le conoce como la "Hipótesis Osmótica".

Uno de los objetivos de este estudio es reproducir in Vitro lo que ocurre in Vivo con los cambios de osmolaridad, por lo que se procede a evaluar dos sustancias hipertónicas, por un lado el cloruro de sodio (NaCl) y por otro el Manitol. Se ensayan diferentes concentraciones, estas se miden con un Osmómetro que determina la concentración de las soluciones en términos de miliosmoles (mOsm) y son los datos que se presentan en la tabla siguiente:

NaCl 0.5% (468 mOsm)	Manitol 5% (528 mOsm)
NaCl 2% (906 mOsm)	Manitol 10% (754 mOsm)
NaCl 4% (1528 mOsm)	Manitol 17% (1278 mOsm)

Luego de obtenidas las concentraciones de las soluciones hipertónicas, estas se evalúan con el ensayo de liberación de beta hexosaminidasa (β -Hex), que se explica en el apartado correspondiente de materiales y método; en la línea celular LAD2, los resultados se presentan en la Figura 1.

El porcentaje de liberación de β -Hexosaminidasa se calcula con esta fórmula

$$\% \beta\text{-Hex} = \frac{\text{OD sobrenadante}}{(\text{OD sobrenadante} + \text{OD Tritón X-100})} \times 100.$$

Por lo que se observa el NaCl produce menores porcentajes de liberación (6.7% el máximo), comparados con el Manitol (28% el máximo). Con estos resultados claramente el Manitol resulta ser el agente osmótico más eficaz para ser utilizado. Por

otra parte la concentración escogida fue la del 10% o 0.55M, ya que produce una liberación fisiológica de mediadores sin causar mayores cambios en la integridad de mastocito, ya que la concentración de 17% produce en las células disminución en su viabilidad.

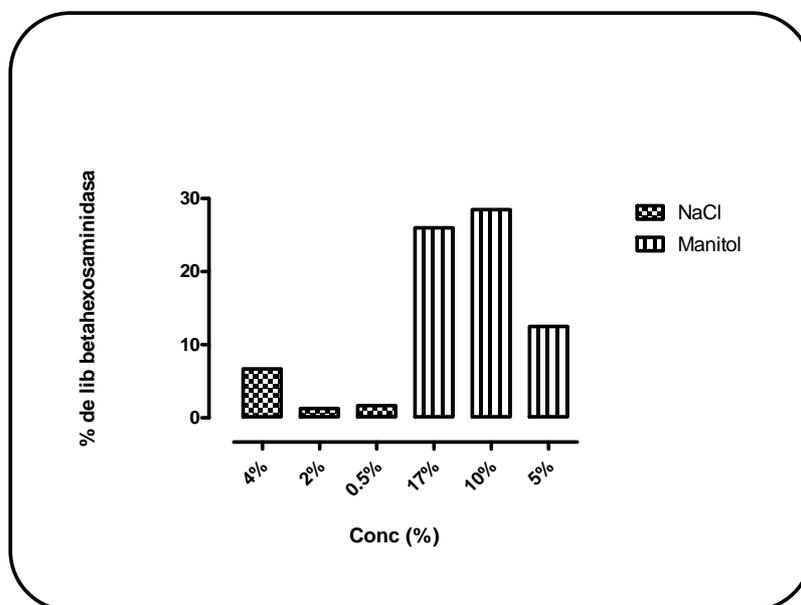


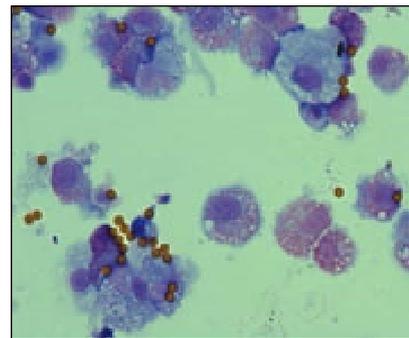
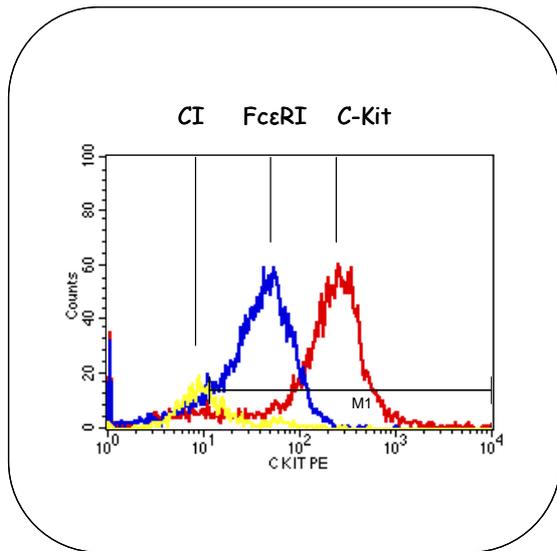
Fig. 1 Ensayo de Beta-hexosaminidasa para escoger el agente osmótico. Mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa con células LAD2, se incuban por 30 minutos con Manitol o cloruro de sodio (NaCl) a diferentes concentraciones. La liberación de β -hexosaminidasa se expresa como el porcentaje de liberación máxima del sobrenadante con respecto al lisado de las células con tritón. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una n=3 experimentos independientes.

A.2 Ensayo del estímulo osmótico en mastocitos de diferentes orígenes:

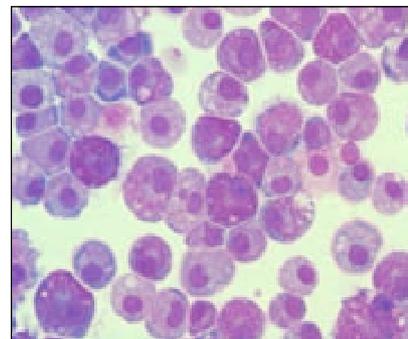
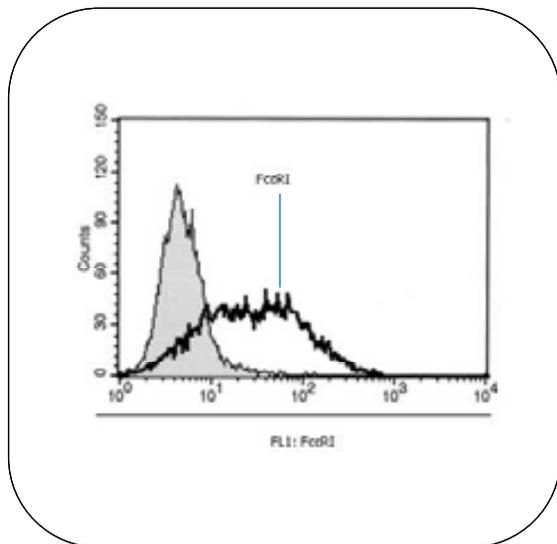
A.2.1 Caracterización de la población de mastocitos por la expresión del receptor Fc ϵ RI y c-kit

El estímulo osmótico fue probado además en cultivos primarios de mastocitos, para compararlos con la línea celular LAD2, las células primarias provienen por una parte del aislamiento de mastocitos de pulmón de pacientes sometidos a cirugía torácica denominados HMCL, y de sangre periférica de donantes sanos que se designan como HuMCs CD34+, los protocolos de obtención y purificación de los cultivos primarios se especifican en la sección de materiales y métodos. Cabe mencionar que las LAD2 son mastocitos con el fenotipo de triptasa-quimasa positivo, y estos mastocitos son los que encontramos en piel y submucosa intestinal, a diferencia de las HMCL y las HuMCs CD34+ que son del fenotipo triptasa positivo, y son los mastocitos residentes en las

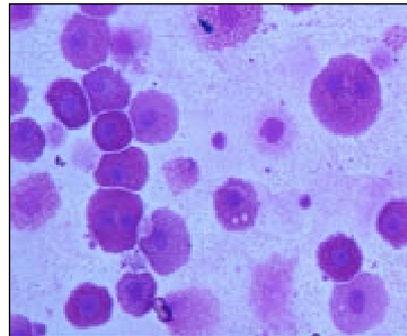
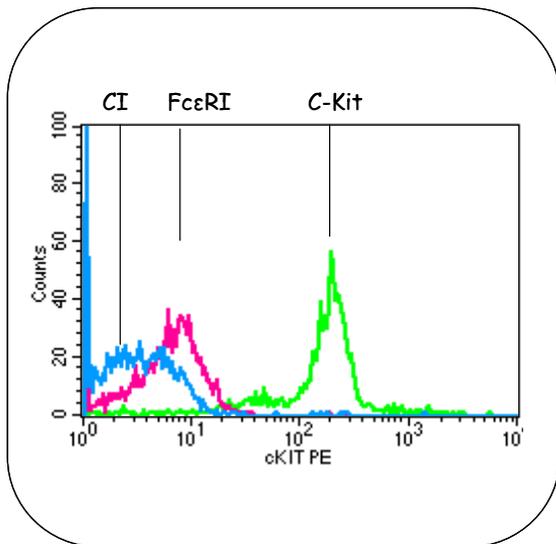
mucosas principalmente de intestino y pared alveolar. Para el grado de pureza de las poblaciones de mastocitos procedentes de cultivos primarios se obtienen al comparar la expresión del receptor de alta afinidad el FcεRI el receptor c-Kit (CD117) mediante el marcaje con anticuerpos específicos para analizar mediante citometría de flujo, además se realizó un citospin marcando las células con la tinción de May-Grunwald para observar las características morfológicas de cada población tal como se observa en la figura 2.



A. Expresión de los receptores en mastocitos obtenidos de pulmón (HMCL)



B. Expresión de los receptores en la línea celular de mastocitos LAD2



C. Expresión de receptores en mastocitos obtenidos de sangre periférica HuMCs CD34+

Fig. 2 Determinación de la expresión del FcεRI y c-kit en mastocitos humanos. Se determina con la ayuda de anticuerpos específicos los niveles de expresión del receptor de alta afinidad y del c-kit en los diferentes tipos de mastocitos utilizados.

Otra de las líneas celulares de mastocitos que se utiliza es las Human mast cell leukemia cells (HMC-1) (Fig. 3), la cual tiene utilidad en los estudios bioquímicos de señalización que se presentan más adelante, pero que tiene deficiencias que limitan su utilidad como en los ensayos de liberación de β -Hex, por una parte son células que crecen sin necesidad de factor de crecimiento (SCF), por la presencia de mutación en el c-Kit, también tiene expresión variable de la subunidad α del FcεRI, que produce datos inconsistentes de desgranulación (Butterfield et al, 1988), además el contenido granular de mediadores es menor comparado con LAD2.

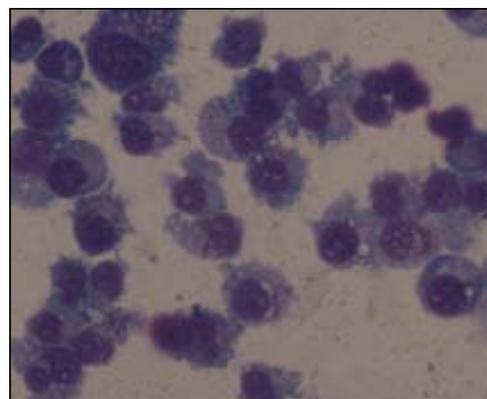
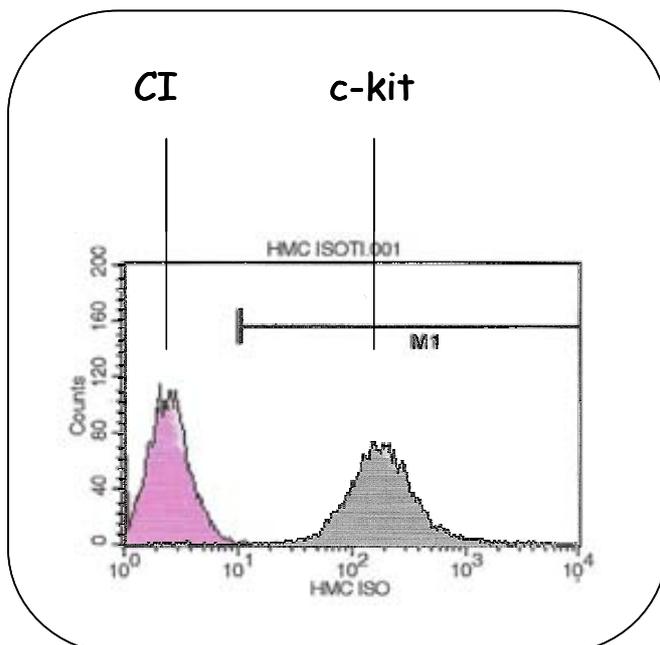


Fig. 3 Expresión de c-Kit en la línea celular HMC-1

A.2.2 Perfil de liberación de β -hexosaminidasa inducido con Manitol mastocitos procedentes de diferentes orígenes

Luego de escoger el estímulo osmótico idóneo y determinar la expresión de receptores de los mastocitos primarios comparados con la línea celular LAD2, se realiza el ensayo de liberación de β -hex. El Manitol a la concentración del 10% o 0.55M induce porcentajes de liberación por encima del 20%, así pues para las células LAD2 fue del 23%, para las HuMCs CD34+ 34% y para las HLMC 23%, estos porcentajes no son diferentes estadísticamente entre ellas, como muestra la Figura 4.

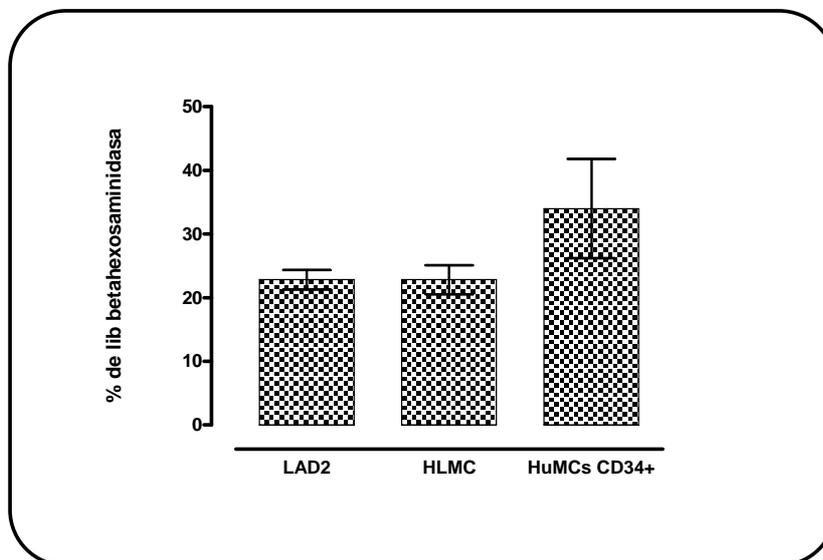
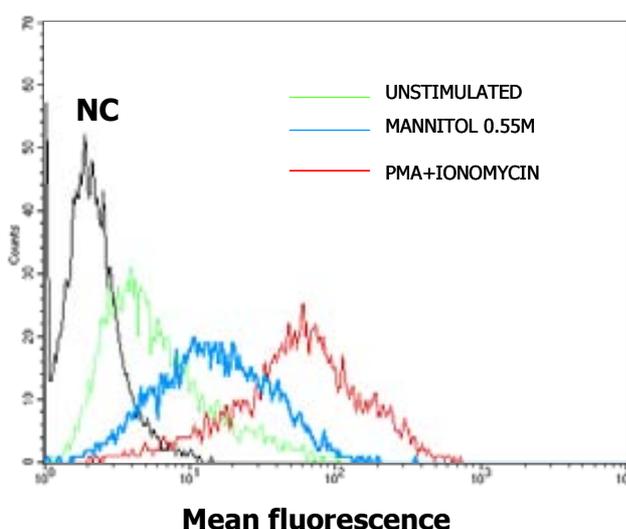


Fig. 4 Ensayo de liberación de β -hexosaminidasa inducido con Manitol en los mastocitos. A 2×10^4 células se determina el porcentaje de liberación de β -hex que induce Manitol 10%, en la línea celular LAD2, en cultivo primario de mastocitos por un lado los aislados de pulmón de paciente (HLMC) y por el otro los mastocitos diferenciados a partir de CD34+ obtenidos de sangre periférica de donantes sanos (HuMCs CD34+). Este ensayo se realiza por triplicado y una $n=3$ experimentos independientes.

A.3 Activación de los mastocitos mediante activación del CD63:

El CD63 es una proteína transmembranal, que se expresa en una variedad de células hematopoyéticas entre estas el mastocitos. Esta proteína parece influir en procesos de adhesión celular, motilidad y fagocitosis/endocitosis. Una fracción del CD63 está localizada en estructuras con contenido granular y es capaz de movilizarlas hasta la

membrana plasmática en respuesta a la activación celular y producir fusión y secreción del contenido almacenado (Schäfer et al, 2010). Para determinar si el estímulo osmótico es capaz de producir la activación del mastocito vía CD63, analizamos mediante citometría de flujo la expresión de esta proteína y la comparamos con un agente ionóforo como estímulo potente, PMA+Ionomicina. En la Figura 5 se observa el comportamiento de las células LAD2 con los tratamientos, el Manitol es capaz de inducir la expresión de la proteína CD63, ya que se observa que el porcentaje es de 85% comparado con las no estimuladas y en menor proporción que el PMA+Ionomicina que es del 97%.



	%	Media
No estimulada	46.38	15.46
Manitol 0.55 M	85.57	24.73
PMA+Ionomicina	97.66	85.86

Fig. 5 Determinación de la expresión de CD63 en LAD2 luego de la estimulación con Manitol.

En este estudio se utilizan 3×10^5 células LAD2 por punto de activación. Se realiza la determinación de la expresión de la proteína CD63 en mastocitos expuestos al estímulo osmótico con Manitol al 10% y se compara con la dosis de PMA (50ng/ml) más ionomicina ($2.5 \mu\text{M}$). Posteriormente las células se centrifugan y se retira el sobrenadante, se lava con tampón de fenotipado y se adiciona el CD63 por 30 minutos, todo el procedimiento se realiza a 4°C , para evitar endocitosis del receptor. Las muestras se analizan por citometría de flujo.

A.4 Efecto del Estímulo Osmótico en el Flujo de Calcio

Uno de los requerimientos críticos para la liberación de los mediadores preformados y los sintetizados de novo en el mastocito, luego de su activación en el flujo de calcio, principalmente desde el espacio extracelular. Este aspecto fue evaluado con las células LAD2, mediante fluorimetría usando la sonda Fluo 4/AM (Molecular Probe, Invitrogen). Se observa en la Figura 6 que al incubar el mastocito con Manitol, este es capaz de

producir el incremento en el flujo de calcio que se mantiene a lo largo del tiempo de observación que fue de aproximadamente 10 minutos o 600 segundos, los datos son representados en unidades relativas de fluorescencia (RFU), comparado con el control.

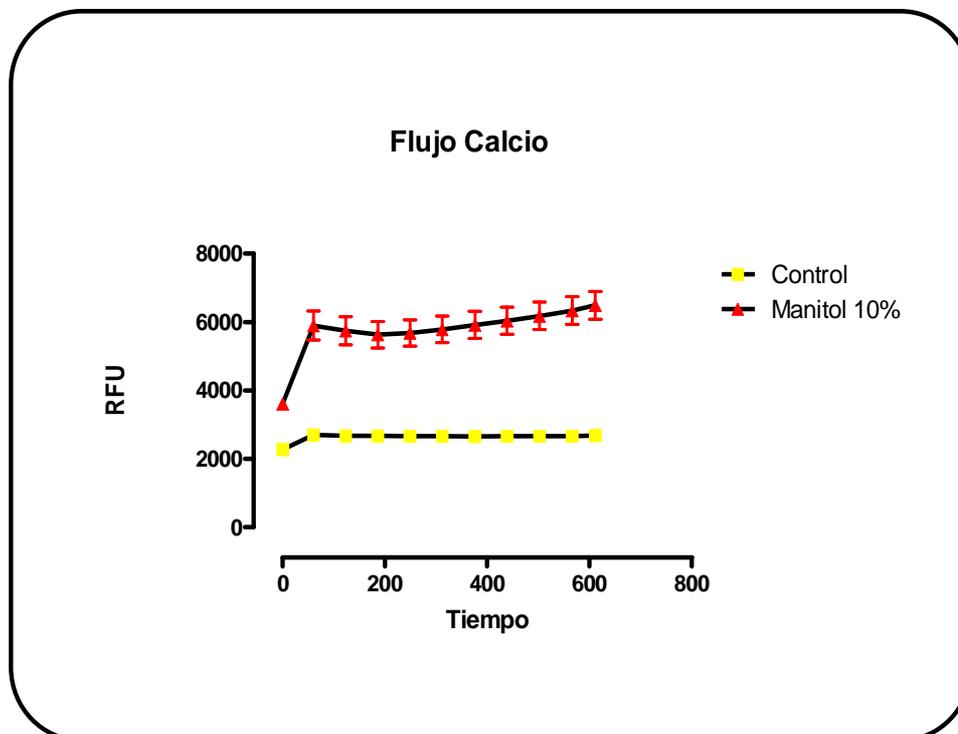


Fig. 6 Determinación del flujo de calcio por Fluorimetría. En este estudio se utilizan 6×10^5 células LAD2, por punto de activación. Las células se van a incubar con la sonda FLUO 4/AM por 30 minutos a 37°C . Luego de esto se centrifugan y se lavan colocándolas en placas de 96 pocillos y luego de tomar la lectura basal de los grupos se incuban con Manitol al 10%. Los resultados se expresan como las unidades relativas de fluorescencia. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una $n=3$ experimentos independientes.

Posteriormente tanto el grupo control como las células activadas con Manitol se incuban simultáneamente con Ionomicina $2.5\mu\text{M}$, este evento se utiliza como monitor de la calidad y validez del experimento. Al introducir la Ionomicina se induce un influjo masivo de calcio a través de la membrana plasmática al citoplasma. En principio la Ionomicina conduce a un colapso del gradiente de calcio transmembranal por lo que se coloca al final del experimento y se realiza la lectura por 5 minutos, los datos en la Figura 7 muestran el salto inmediato que experimentan los dos grupo de células tras la administración del agente ionóforo.

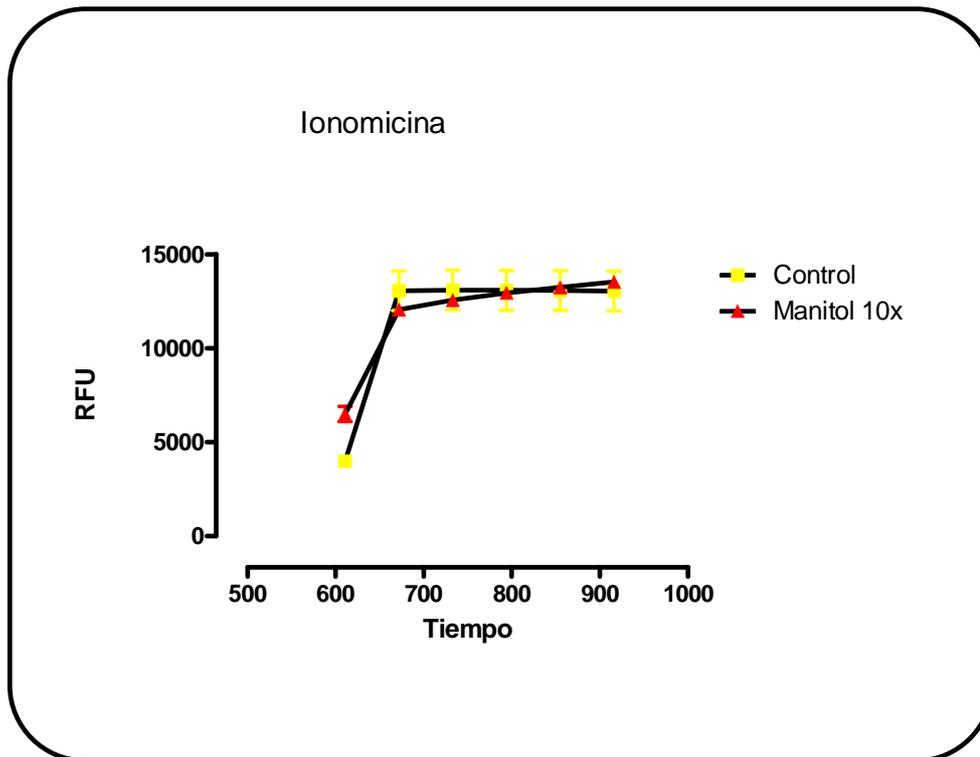


Fig. 7 Determinación del flujo de calcio con la administración de Ionomicina. Luego de transcurrido el tiempo de lectura del flujo de calcio con el Manitol y el grupo control, se incuban las células con Ionomicina 2.5 μ M, y se realiza la lectura por 5 minutos, esto produce un flujo masivo de calcio que nos da información sobre la viabilidad de las células y la validez del experimento, tal como se observa en la gráfica representativa en ambos grupos el flujo de calcio inicia y se mantiene muy similar.

Otro aspecto evaluado en cuanto al flujo de calcio, fue realizar este mismo protocolo pero en condiciones de en las que el calcio extracelular estuviera reducido con el uso de un tampón hipocalcémico, con el objetivo de determinar la importancia de este ión en el mecanismo de activación del manitol, tal como se presenta en la Fig. 8, los mastocitos en un medio con poca disponibilidad de calcio apenas son activados cuando se administra el manitol y ante el uso de el ionóforo las lecturas fluorimétricas son menores (Fig. 9), comparadas cuando se utiliza un tampón con concentraciones óptimas de calcio.

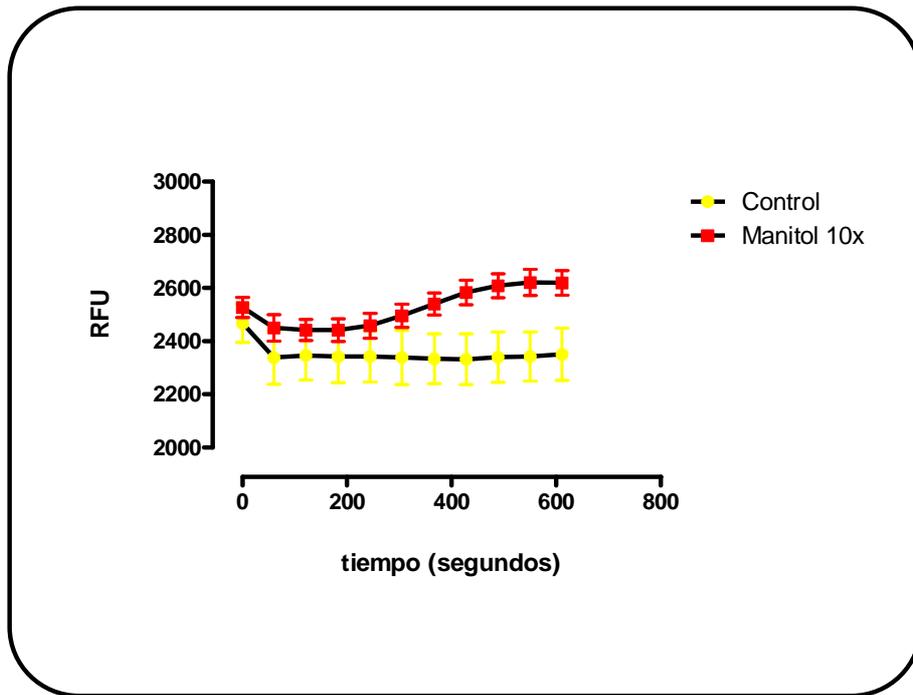


Fig. 8 Determinación del flujo de calcio por Fluorimetría sin calcio extracelular. En este estudio se utilizan 6×10^5 células LAD2, por punto de activación. Las células se van a incubar con la sonda FLUO 4/AM por 30 minutos a 37°C . Luego de esto se centrifugan y se lavan colocándolas en placas de 96 pocillos y luego de tomar la lectura basal de los grupos se incuba con Manitol al 10%. Los resultados se expresan como las unidades relativas de fluorescencia. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una $n=3$ experimentos independientes.

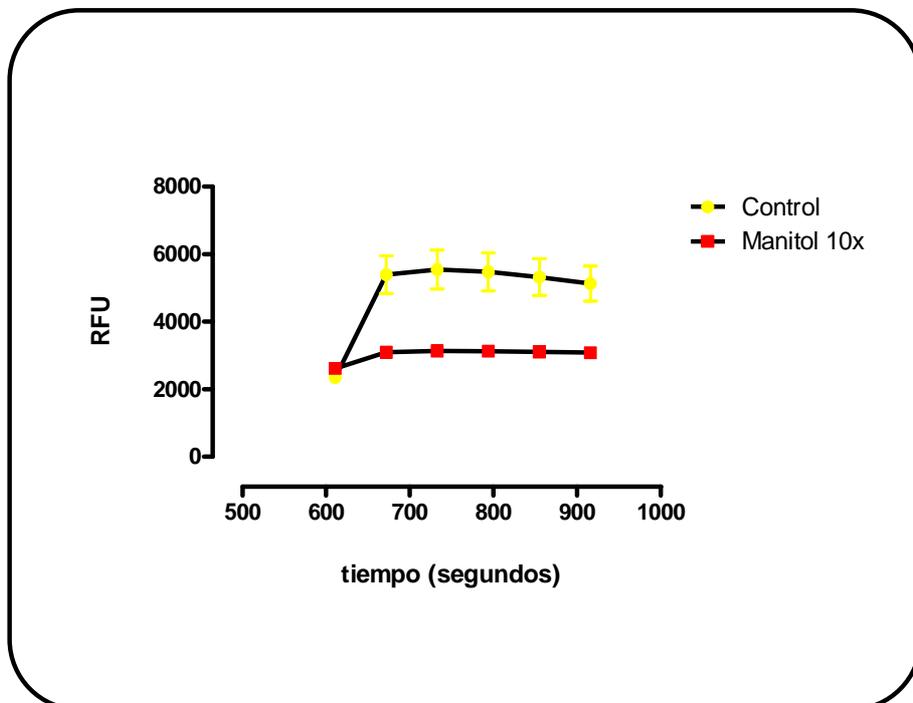


Fig. 9 Determinación del flujo de calcio con la administración de Ionomicina sin calcio extracelular. Luego de transcurrido el tiempo de lectura del flujo de calcio con el Manitol y el grupo control, se incuban las células con Ionomicina $2.5\mu\text{M}$, y se realiza la lectura por 5 minutos, esto produce un flujo masivo de calcio que nos da información sobre la viabilidad de las células y la validez del experimento, tal como se observa en la gráfica representativa en ambos grupos el flujo de calcio inicia y se mantiene muy similar.

A.5 Efecto del estímulo osmótico en la Dinámica del Citoesqueleto mediante el marcaje con Faloidina

El citoesqueleto de actina está constituido por microfilamentos y es regulado por proteínas relacionadas o de unión a la actina globular (G-actina) o filamentosa (F-actina). Los microfilamentos participan en el movimiento celular proporcionando una fuerza de locomoción resultante del fenómeno de polimerización de actina, y por otra parte contribuyen al transporte intracelular donde pasan moléculas y estructuras membranosas (Mitchison, 1995).

La dinámica del citoesqueleto de actina puede modificarse mediante el uso de sustancias naturales como la faloidina, que particularmente estabilizan la actina. Este proceso es parte de la reorganización del citoesqueleto, que en este caso se observa luego de la activación de una serie de mecanismos de señalización. Para observar el efecto en la polimerización de actina se utilizó por un lado las imágenes en el microscopio de fluorescencia en la Figura 10, y por otra en la Figura 11 con los resultados de la citometría de flujo. Las células LAD2 luego de los tratamientos con Manitol y PMA+Ionomicina por 10 minutos, son fijadas y permeabilizadas, y posteriormente marcadas con faloidina-TRICT. En las imágenes del microscopio de fluorescencia se observa como en las LAD2 sometidas a un estímulo osmótico hay un aumento en la formación de ondulaciones en la membrana que es un tipo de ensamblaje de los microfilamentos, también conocido como *ruffling*, comparadas con las controles que conservan la forma alrededor del núcleo marcado con Hoechst 33258 de color azul.

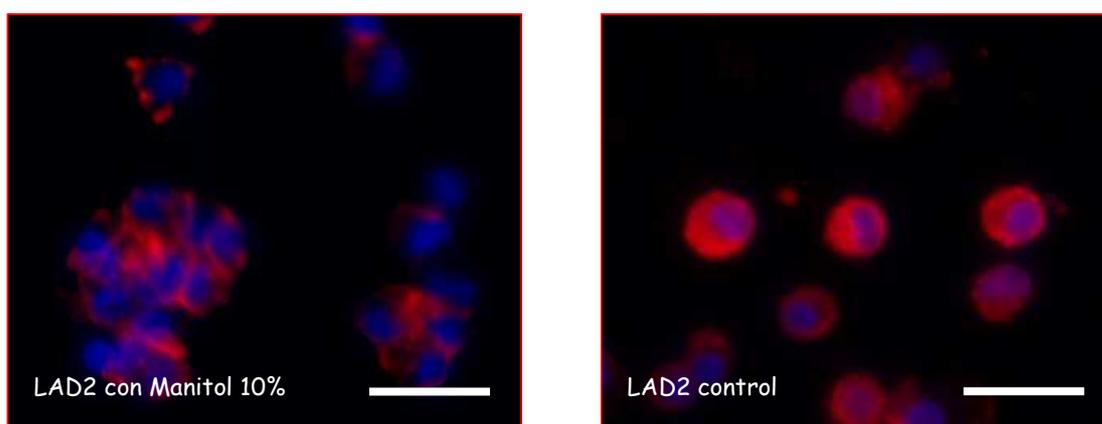


Fig. 10 Estudio de reorganización del citoesqueleto por microscopía. 1×10^5 células LAD2 se colocan en cubreobjetos previamente tratados con polilisina porque son células que crecen en suspensión, y se incuban con Manitol 0.55M por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar las células, se fijan con paraformaldehído al 4%, se fijan con saponina al 0.1%, se bloquean con BSA al 0.1% y se

marcan con Faloidina conjugada con TRITC. Se realiza el montaje en los portaobjetos y las muestras son analizadas por microscopía de Fluorescencia. Escala de la barra 10µm.

El proceso de alteración de la polimerización del citoesqueleto de actina en células LAD2 después de la activación con Manitol 10%, también se evalúa mediante citometría de flujo, aunque mediante esta técnica los valores de la media comparados con el control no son diferentes estadísticamente, se percibe la tendencia a producir la reorganización del citoesqueleto con el estímulo osmótico, estos datos se complementan con lo observado en las imágenes de microscopia por fluorescencia. También se representa la media del grupo de células tratadas con un estímulo potente como es el PMA+Ionomicina.

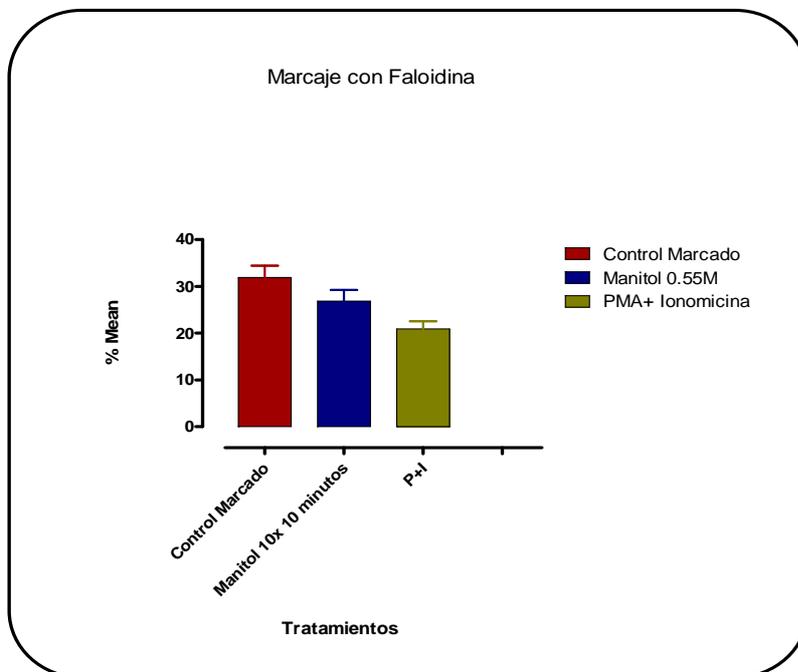


Fig. 11 Estudio de reorganización del citoesqueleto mediante citometría de flujo. En este estudio se utilizan 1×10^5 células LAD2 por punto de activación. Un punto de activación lo representa el Manitol 10%, el otro PMA (50ng/ml) más Ionomicina (2.5µM) y otro control. Luego de centrifugar y lavar las células, se fijan con paraformaldehído 4%, permeabilizan con saponina 0.1%, bloquea con BSA 0.1% y se marca para citometría con Phalloidina conjugada con TRITC, todo el procedimiento se realiza en frío (4°C). La gráfica representa la media de 3 experimentos independientes.

A.6 Efecto del Estímulo Osmótico en las vía de activación de las MAP quinasas ERK1/2 y Akt.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son una familia de enzimas que forman una red integrada requerida para controlar funciones celulares especializadas tales como diferenciación, proliferación y muerte celular. Estas proteínas citoplasmáticas pueden modular la actividad de otras proteínas intracelulares al añadir grupos fosfatos a los aminoácidos serina/treonina. A este grupo de quinasas pertenecen las ERK1/2, JNK y la p38 (Fig. 12)

Las células eucariotas sienten y responden a los estímulos extracelulares mediante la vía de activación de la MAPK que es una cascada de activación de tres quinasas que actúan de manera subsiguiente. La MAPK es activada por fosforilación en los residuos conservados de tirosina o treonina por una MAPKK o MEK de especificidad dual, luego de esto la MAPKK es activada por fosforilación en los residuos conservados de serina y treonina por la MAPKKK o MEKK (Wilkinson & Millar, 1998).

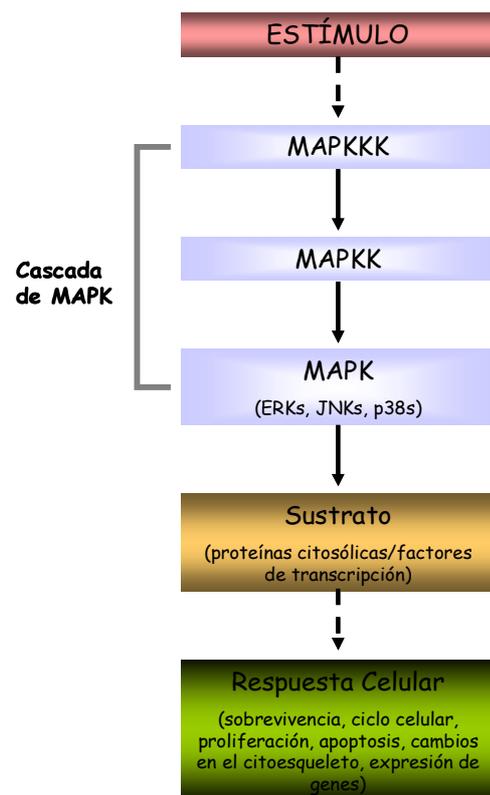


Fig. 12 Esquema de Activación de la Vía de las MAP quinasas.

En el caso de Akt/PKB que es una serina/treonina proteína quinasa que tiene un papel clave en múltiples procesos celulares tales como el metabolismo de la glucosa, proliferación celular, apoptosis, transcripción y migración celular. La Akt posee un dominio PH o dominio de homología a Plextrina, este dominio se une a los fosfoinositos con alta afinidad, como fosfoinositol-3- fosfato (PIP3) o fosfoinositol-2- fosfato (PIP2). Esto es útil para el control de la señalización celular porque el PIP2 solamente es fosforilado por la familia de enzimas fosfoinositol-3 quinazas (PI3K) (Fig 13).

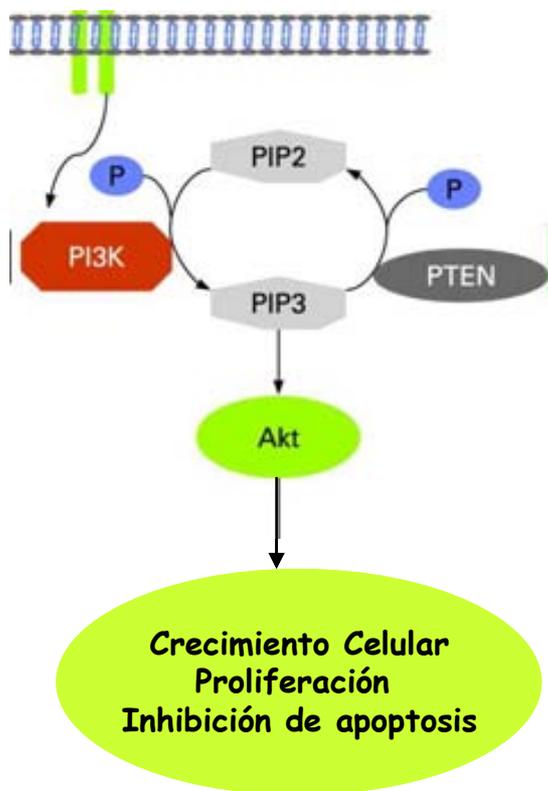


Fig. 13 Esquema de Activación de la vía de Akt

Para caracterizar cómo afecta el estímulo osmótico estas vías de señalización, se evalúa con las técnicas de western blot para observar el estado de fosforilación de pERK por un lado y de pAkt con las células LAD2 activadas con manitol, PMA+ Ionomicina, y el control, el tiempo de activación fue de 15 minutos. Se observa como al activar con Manitol la fosforilación de pERK y pAkt aumentan con respecto al control, tal como se observa en la Figura 14 se gráfica la densitometría del blot al normalizar los valores obtenidos de pERK y pAkt con la lectura de ERK total, utilizado como control de carga.

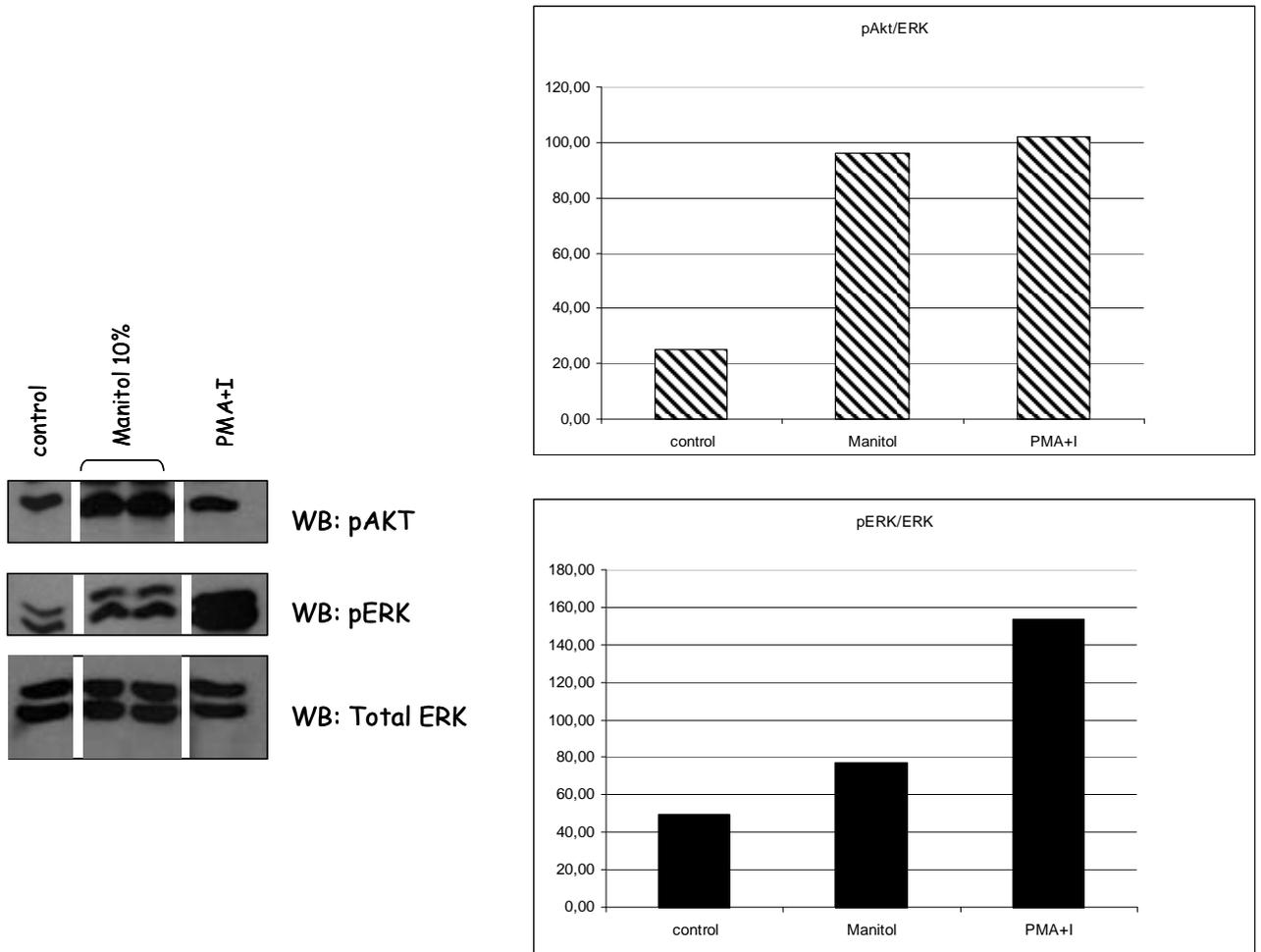
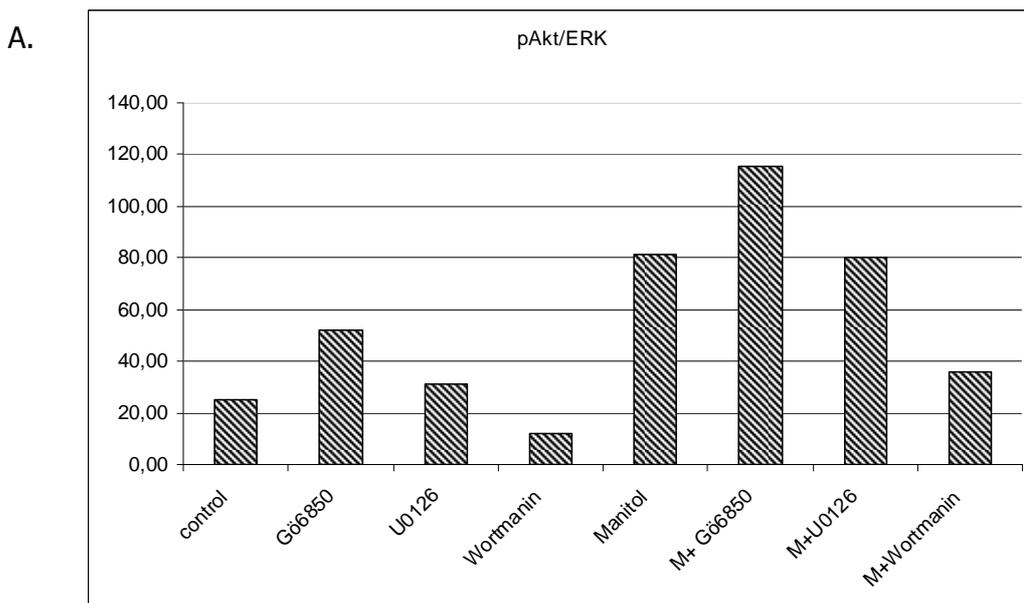


Fig. 14 El estímulo osmótico incrementa la fosforilación de MAPK ERK ½ y pAKT. Para este experimento 0.5×10^6 células por punto de activación se incubó con Manitol 10% y PMA (50ng/ml) más ionomicina ($2.5 \mu\text{M}$), 30 minutos a 37°C . Posteriormente las células se lisan, con estos lisados se corre el gel de SDS-Page al 10% y se transfiere a una membrana de PVDF, que va ser incubada con los anticuerpos anti-ERK fosforilado, anti-Akt fosforilado y un anticuerpo anti-ERK total como control de carga.

A.7 Efectos de los Inhibidores de MAP quinasas y PI3 quinasa en la activación osmótico de mastocitos

Basados en los resultados anteriores en lo que el estímulo osmótico es capaz de incrementar la fosforilación de pERK y pAkt; producto de la capacidad del manitol de activar el mastocito y producir desgranulación, se utilizan los inhibidores selectivos de PI3K (Wortmanina), de pERK (U0126) y de PKC (Gö6850). Las células LAD2 fueron pre-incubadas con 10uM de los respectivos inhibidores durante 30 minutos luego del cual se activan con manitol al 10% por 15 minutos, acto seguido se lisan las células y se realiza el western blot para evaluar el grado de fosforilación de cada vía de señalización y ver el nivel de afectación producido por los respectivos inhibidores. Wortmanina es un inhibidor covalente específico de PI3K, el U0126 es un inhibidor selectivo tanto de MEK1 y MEK2 un tipo de MAPK/ERK quinasa y el Gö6850 que es un inhibidor de Proteína quinasa C (PKC) que proporciona información indirecta de la vía de fosfolipasa C gamma (PLC γ) como vía de señalización en los procesos de movilización de calcio. En la Figura 15 se observa que luego del estímulo con Manitol, la Wortmanina afecta parcialmente la fosforilación de pAkt, que es la señal indirecta de PI3 quinasa, en cambio el U0126 inhibe totalmente la fosforilación de pERK y el Gö6850 no afecta la fosforilación de las proteínas evaluadas. Estos inhibidores se evaluaron en proceso de desgranulación con el ensayo de β -hex pero sin mostrar datos concluyentes al utilizar el estímulo osmótico.



B.

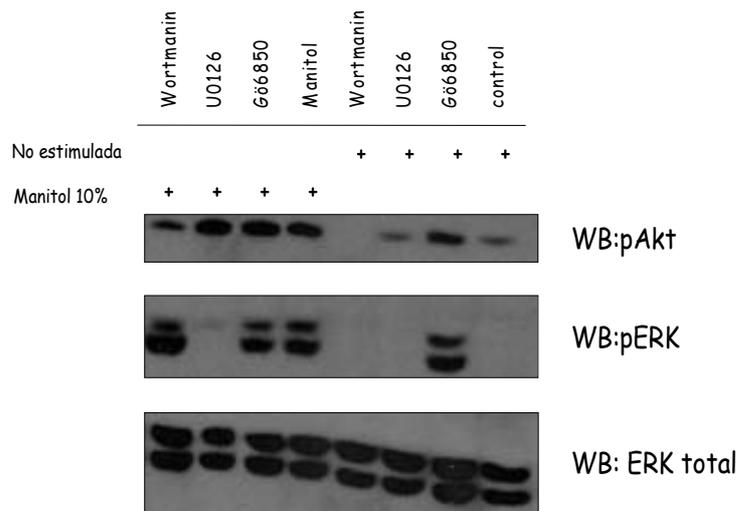
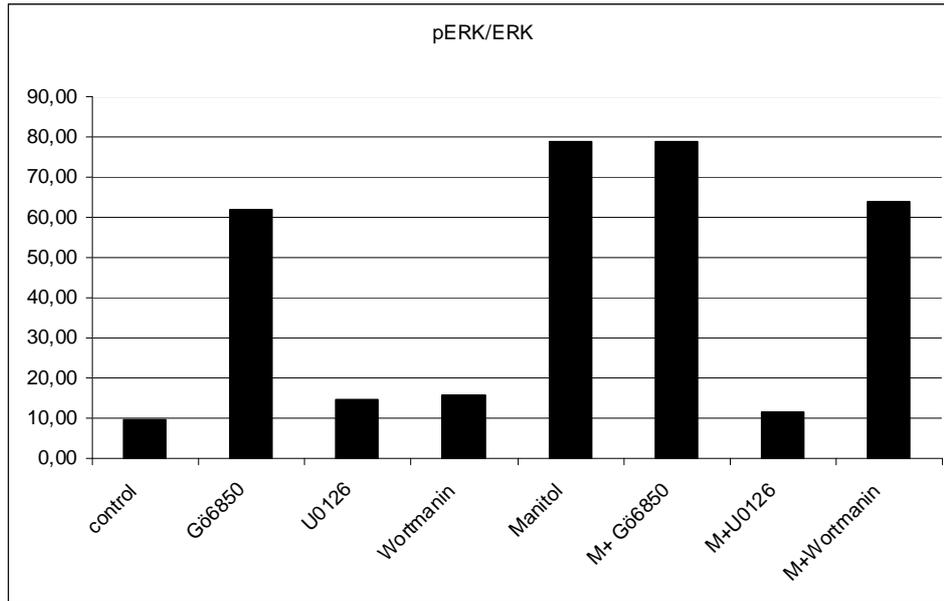


Fig. 15 Evaluación de Inhibidores de MAP quinasa y PI3 quinasa en la activación osmótica de mastocitos. En este estudio se utilizan 0.5×10^6 células por punto de activación, se incuban por 10 minutos con los respectivos inhibidores de MAP quinasa, Wortmanin ($10 \mu\text{M}$) Inhibidor de PI3 quinasa, U0126 ($10 \mu\text{M}$) Inhibidor de ERK1/2, Gö6850 ($10 \mu\text{M}$) Inhibidor de PKC. Luego de este tiempo se administra Manitol 10%, se incuba 15 minutos a 37°C . Posteriormente las células son lisadas y se corre un gel de SDS-PAGE al 10% y se transfiere a una membrana de PVDF, que se incuba con los anticuerpos para anti ERK fosforilado, anti-Akt fosforilado y anti-ERK total como control de carga.

A.8 Efecto del estímulo osmótico en la síntesis y liberación de otros mediadores inflamatorios

Con los datos obtenidos en la primera parte se observa que los mastocitos, luego de su activación con Manitol, son capaces de liberar β -hex; que es una medida indirecta de mediadores preformados contenidos en los gránulos de estas células, en esta parte del estudio se evalúa si el estímulo osmótico es capaz de inducir síntesis de novo de mediadores lipídicos y la síntesis de citocinas. Particularmente, el interés se centra en la PGE_2 , que es un mediador lipídico potente producido en tejidos inflamados, y que puede influir en la respuesta del mastocito en situaciones que incluyen adhesión a proteína de la membrana basal, quimotaxis y producción de quimiocinas (Kuehn et al, 2010). En la siguiente sección se determina si el estímulo osmótico es capaz de inducir la síntesis de citocinas como el TNF- α y quimiocinas como la IL-8.

A.8.1. Evidencia de síntesis de novo de mediadores lipídicos

Las células LAD2 son incubadas con Manitol por 30 minutos y 4 horas, y luego de recoger el sobrenadante se realiza el ensayo de ELISA para detectar la cantidad de PGE_2 producido. Debido al rápido metabolismo de la PGE_2 se utiliza un metabolito estable de ésta para la medición indirecta de su síntesis tal como se explica en el apartado de materiales y métodos.

Los datos obtenidos se presentan en pg/ml de PGE_2 en 2×10^6 células, y se promedia una lectura a los 30 minutos en el que PMA+Ionomicina produce 93pg/ml y de 62pg/ml a las 4 horas, por otro parte el Manitol a los 30 minutos produce 12pg/ml y de 38pg/ml a las 4 horas, tal como se observa en la Figura 16, estos datos corroboran el hecho de que el estímulo osmótico es capaz de inducir síntesis de novo de PGE_2 .

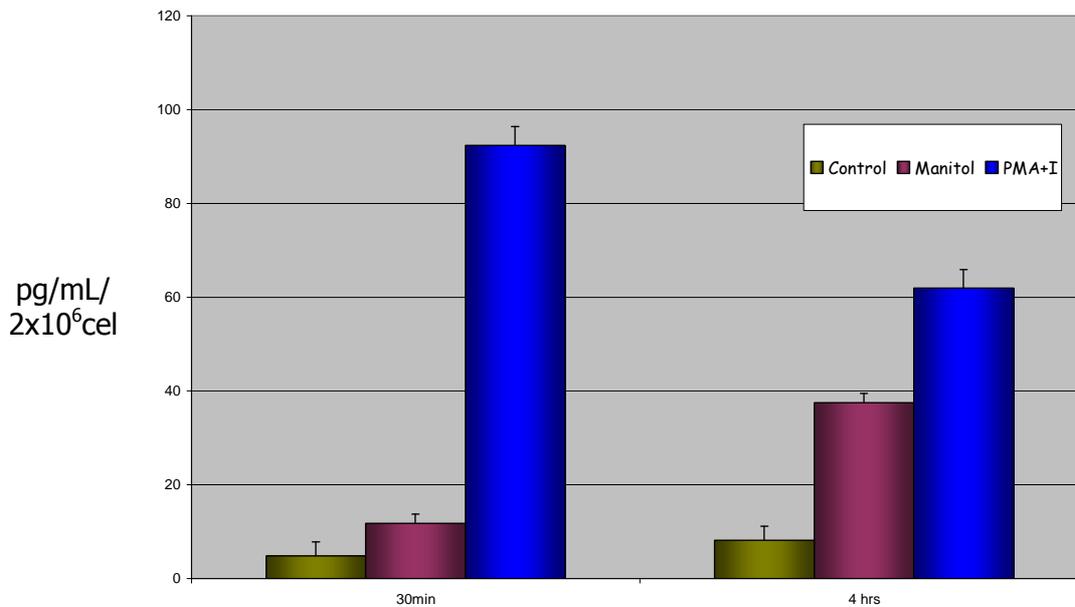


Fig. 16 Síntesis de novo de PGE₂ luego de estimular con Manitol. 2x10⁶ células LAD2 por cada punto de activación se incuban por 30 minutos y 4 horas con Manitol 10%, PMA (50ng/ml) más ionomicina (2.5μM) y un grupo sin activar. Los datos son presentados como los pg/ml de PGE₂ en el sobrenadante.

A.8.2 Síntesis de citocinas inducidas por el estímulo osmótico:

Luego de la activación del mastocito, éste inicia una serie de eventos intracelulares en el que uno de los puntos culminantes y que determinará en parte la respuesta inmune en los diferentes procesos fisiopatológicos es la síntesis de citocinas, aunque algunas se encuentran preformadas en pequeñas cantidades, cómo es el caso del TNFα.

Las citocinas TNFα, IL-1, IL-6, IL-8, IFNα e IFNγ son mediadoras de la inmunidad natural y del reclutamiento linfocitario necesario para la respuesta inmune específica. La interleucina 8 (IL-8), es un miembro de la familia de las quimiocinas y ejerce un papel primordial en la iniciación de la respuesta inflamatoria al promover la quimiotaxis y posterior desgranulación de los neutrófilos. Además, desarrolla una acción quimiotáctica sobre otras células entre las que se encuentran los linfocitos T y los basófilos. Sobre estos últimos estimula la liberación de histamina. Algunas de las acciones proinflamatorias del TNFα y la IL-1 son mediadas por la secreción de IL-8, que por tanto actúa como un mediador secundario de los procesos inflamatorios.

Por lo antes mencionado en esta parte se mide la expresión de ARN mensajero en las células LAD2 de TNF alfa y de IL-8 después de 6 horas de estimulación, comparando el Manitol 10% con un estímulo potente como es la PMA+Ionomicina por RT-PCR utilizando la cuantificación relativa (RQ) de la expresión de los genes en estudio. Los resultados se presentan en la figura 17, se observa que el Manitol al 10% es capaz de inducir la síntesis de IL-8 y de TNF-alfa.

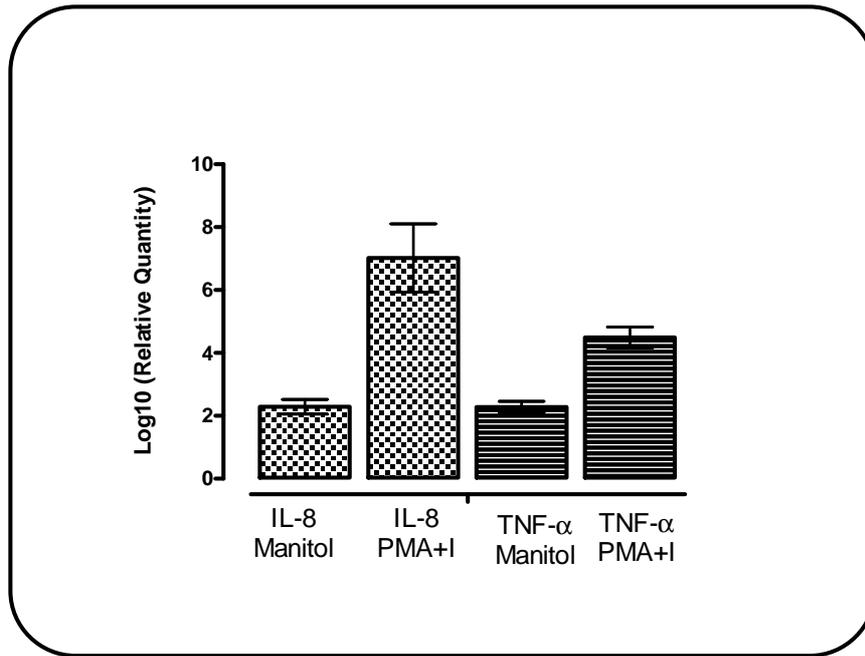


Fig. 17 Determinación de la síntesis de citocinas (TNF-alfa/IL-8) inducidas por el estímulo osmótico por RT-PCR. 2×10^6 células LAD2 por cada punto de activación se incuban durante 6 horas con Manitol al 10%, PMA (50ng/ml) más ionomicina ($2.5 \mu\text{M}$) y un grupo sin activar. Transcurrido este tiempo se recogen las células y se extrae el ARN, y la expresión de los genes se mide por PCR a tiempo real, con respecto al control no activado, la beta-actina se utiliza como control endógeno; se representa una media de 3 experimentos independientes, los datos son presentados como el promedio del Log10 de la cantidad relativa (RQ).

B. Modulación de la activación del mastocito por cambios osmóticos en respuesta a la inhibición de las Ciclooxygenasas.

Como se describe en el apartado de mediadores sintetizados por el mastocito en respuesta al estímulo osmótico, en el que se obtienen niveles de PGE_2 el cual es uno de los metabolitos de la hidrólisis del ácido araquidónico, tal como aparece en el esquema de la Figura 16, que tiene importancia en el asma por los efectos antiinflamatorios y broncodilatadores que ejerce, el siguiente paso es evaluar si al bloquear o inhibir las enzimas ciclooxygenasas, COX-1 y COX-2, responsables de la producción de prostaglandinas, cómo se ve afectada la desgranulación del mastocito o las vías de señalización intracelular.

La producción de eicosanoides se inicia por la liberación del ácido araquidónico (AA) luego de la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana por la fosfolipasa A_2 (PLA_2) y otras enzimas. El AA es metabolizado a diferentes eicosanoides por distintos sistemas enzimáticos. La dos mayores vías son las Ciclooxygenasas (COXs), COX-1 y COX-2, produciendo las prostaglandinas y tromboxanos y las Lipooxygenasas (LOXs) que producen los leucotrienos (Fig. 18). A su vez los eicosanoides tienen efectos biológicos tanto pro-inflamatorios como antiinflamatorios que dependerá de los diferentes órganos o tejidos que son blancos de sus acciones (Yedgar et al, 2007).

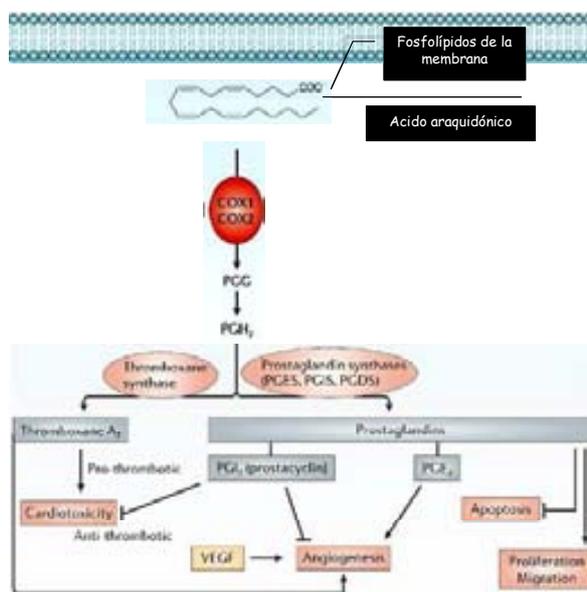


Fig. 18 Metabolismo del Acido Araquidónico. Esquema de la producción del prostaglandinas (PGs) a partir de la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana celular; principalmente se representa la vía de las Ciclooxygenasas (COXs).

B.1 Silenciamiento de las Ciclooxygenasas COX-1/COX-2 mediante el uso del ARN de interferencia (siRNA).

Para evaluar el efecto del estímulo osmótico bajo condiciones en donde las enzimas ciclooxygenasas estuvieran inhibidas se procede a utilizar la técnica de silenciamiento de ARN mensajero mediante el uso del ARN de interferencia, con la cual se puede reducir (knock-down) o perder (knock-out) la expresión de un gen en células de mamíferos (in vitro) e inclusive en animales (in vivo). Esta interferencia se logra, mediante la introducción a nivel celular de un ARN de doble cadena pequeño de unos 21 – 27 pb (siRNA), el cual es reconocido a nivel celular por una maquinaria ancestral que media la degradación o supresión específica del o los mRNA(s) que contiene la secuencia complementaria al siRNA introducido o producido, produciéndose principalmente una degradación del mRNA citoplasmático y una disminución de la traducción del mensaje. En este caso en particular, las células LAD2 fueron silenciadas con siRNA para COX-1 y COX-2 por separado, mediante el uso del HiPerFect Transfection Reagent® que es una mezcla de cationes y lípidos neutros capaz de produce la entrada y liberación eficiente del siRNA dentro de la célula, además las sondas de los siRNA para COX-1 y COX-2 están marcados con fluorocromos que permiten monitorizar mediante citometría de flujo la entrada a la célula tal como se muestra en la figura 19.

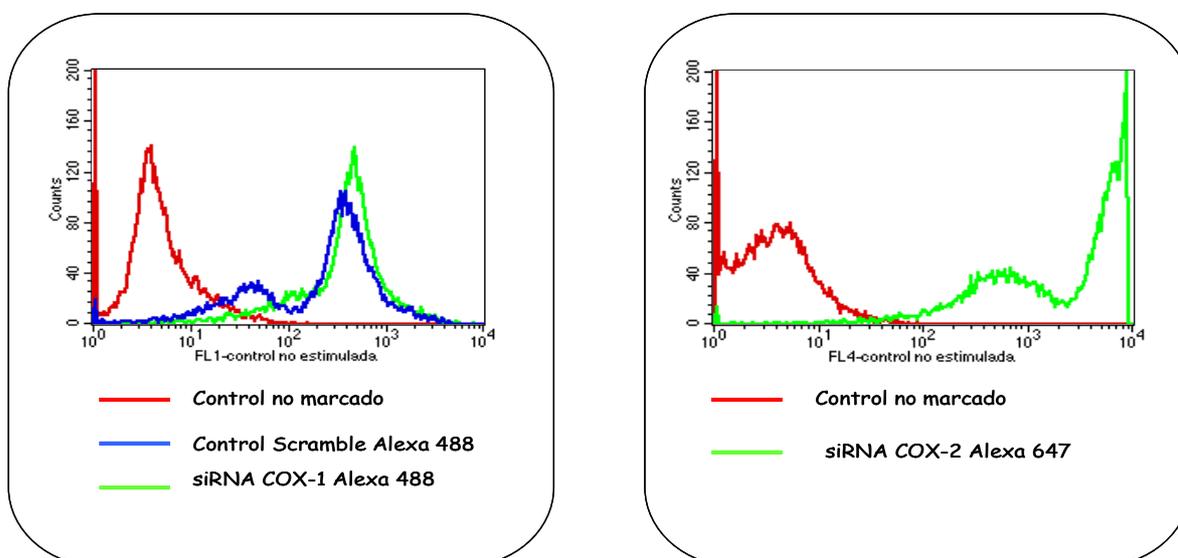


Fig. 19 Monitorización de la transfección con siRNA de COX1/COX2 en células LAD2, mediante citometría. 3×10^5 células LAD2 por punto de silenciamiento luego de 6 horas de incubación con el complejo de transfección (Hyperfect®) se analizan por citometría y se comprueba que el siRNA está dentro de la célula.

Posteriormente, de acuerdo a la cinética de eliminación del RNA mensajero de las COXs se realiza el lisado de las células y el western blot para determinar si la enzima es silenciada o no. En primer lugar la línea LAD2 muestra el inconveniente de que al tener un ciclo de crecimiento lento por lo que las cinéticas de depuración para las proteínas ya sintetizada se prolonga y no se puede obtener el silenciamiento de los genes de manera eficiente, por otra parte las concentraciones requeridas de los siRNA son de 350 μ M, ya que al disminuir esta cantidad no se inhibe ni de forma parcial la expresión de la enzima tal como se observa en la figura 20, en que al cuarto día de silenciamiento las enzimas disminuye la fosforilación con respecto al control de COX-1 y COX-2, pero esta inhibición no es suficiente para poder evaluar el efecto del estímulo osmótico que se mide mediante el ensayo de β -hex con células sometidas al proceso de silenciamiento, por lo que se procede a la inhibición farmacológica con el uso de antagonistas. Otro dato importante es que la línea celular LAD2 al proceder de un proceso inflamatorio como es la mastocitosis presenta niveles basales de COX-2 elevados tal como se observa en la banda de western blot correspondiente.

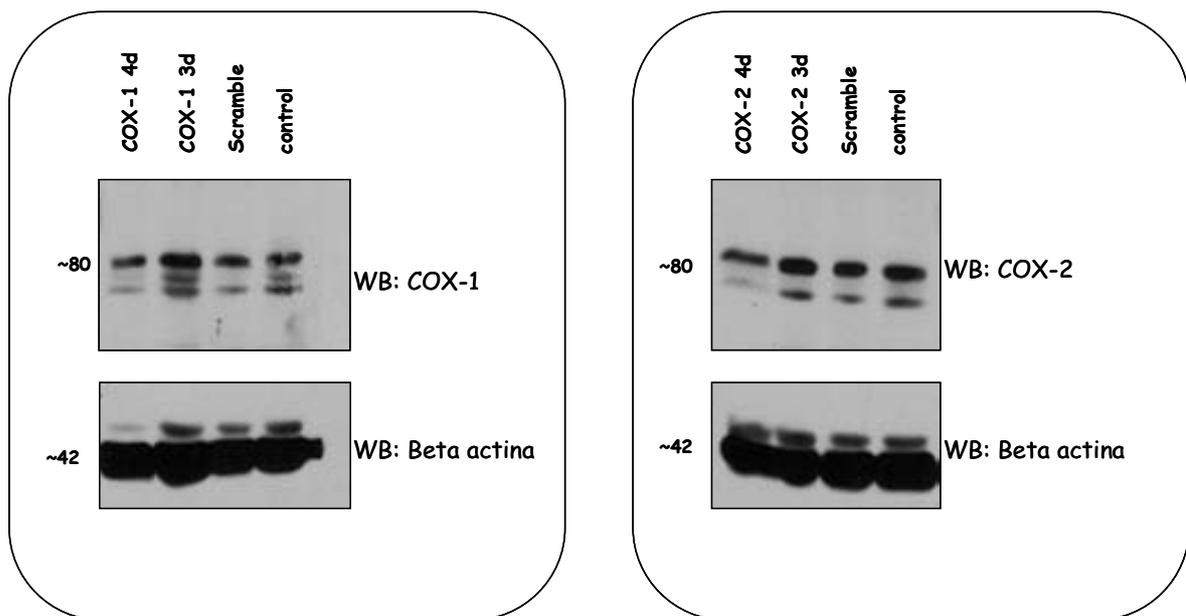


Fig. 20 Silenciamiento de COX-1/COX-2 con ARN de interferencia en LAD2. 0.5x10⁶ células LAD2 por punto de activación luego de transcurrido 3 ó 4 días desde la transfección de los siRNA, son lisadas y las muestras se corren en un gel de SDS-PAGE al 10%. Después son transferidas a una membrana de PVDF que se incuban con anticuerpos anti-COX1 y anti-COX2 y un anticuerpo para beta-actina como control de carga.

B.2 Inhibición Farmacológica de COXs

Al descartar el uso de siRNA por los resultados obtenidos con los genes de COXs, la otra intervención para inhibir estas enzimas es mediante el uso de bloqueadores farmacológicos. La primera enzima en la vía de la síntesis de PGs es la PGG/H sintasa, también conocida como COX. Esta enzima convierte el AA en intermediarios inestables PGG₂ y PGH₂ que lleva a la producción de tromboxanos A₂ y una variedad de prostaglandinas como la PGE₂ (Goodman & Gilman, 2006) tal como se observa en el esquema de la figura 12. Otra acotación importante es que la COX-1 es una enzima constitutiva y la COX-2 es inducible, las citoquinas y otros mediadores inflamatorios son inductores de la producción de esta enzima. En esta parte se utilizan inhibidores selectivos de la COXs y luego de 10 minutos de incubación se activan las células LAD2 con Manitol al 10% por 30 minutos, para los ensayos de liberación de β -Hexosaminidasa. Se utiliza el SC-560 que es el inhibidor selectivo de COX-1 a una concentración de 10nM (Brenneis et al, 2006), el inhibidor selectivo de COX-2, NS-398 a 10 μ M (Mikuni et al, 1998) y Aspirina que es un inhibidor no selectivo de COXs a 5mM (Grosman N, 2007) (Figura 21).

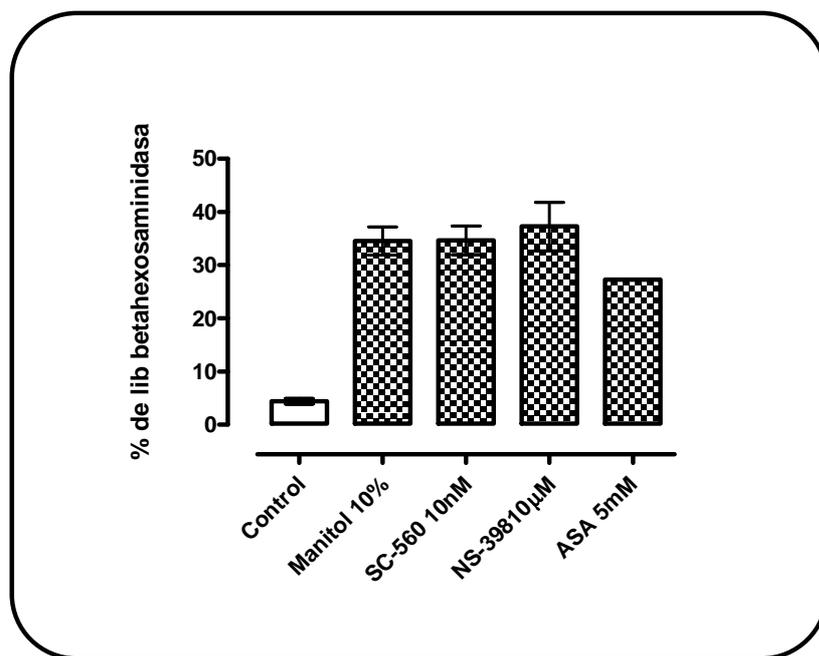


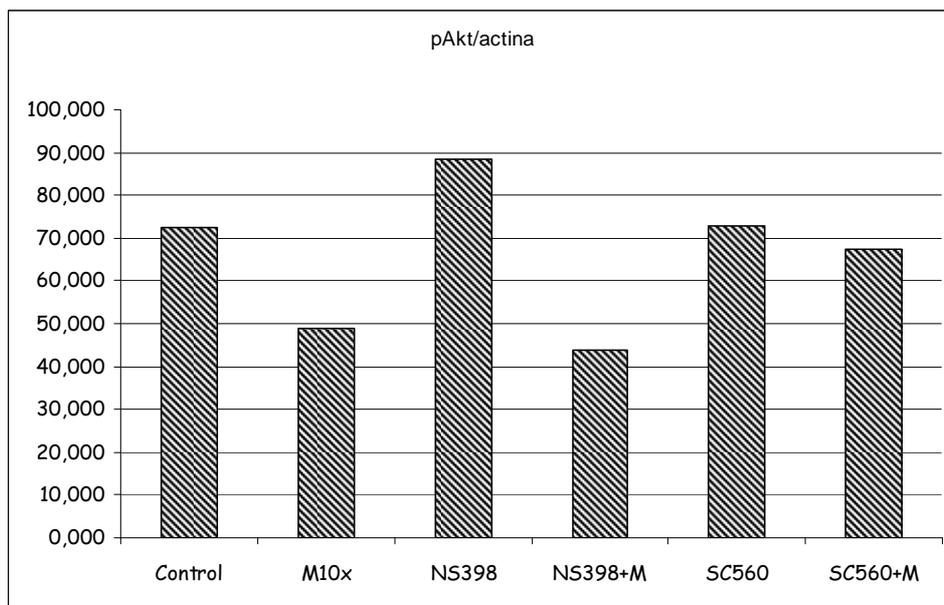
Fig. 21 Ensayo de β -hexosaminidasa para evaluar el efecto de los inhibidores de COXs con el estímulo osmótico. 6x10⁶ células LAD2 por punto de activación se incuban por 10 minutos con: SC-560 (10nM) el inhibidor selectivo de COX-1, NS-398 (10 μ M) el inhibidor selectivo de COX-2, ASA (5mM) inhibidor no selectivo de COXs, posteriormente se adiciona el Manitol 10%. La liberación de β -hex se expresa como el porcentaje de liberación máxima del sobrenadante con respecto al lisado de las células con tritón. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una n=3 experimentos independientes.

Los resultados muestran que los inhibidores de ciclooxigenasas no modifican la liberación de β -hex inducida con Manitol, aunque con el NS-398 se observa un pequeño incremento y con el ASA es menor el porcentaje de liberación, estas liberaciones no son significativamente diferente comparadas con el estímulo osmótico.

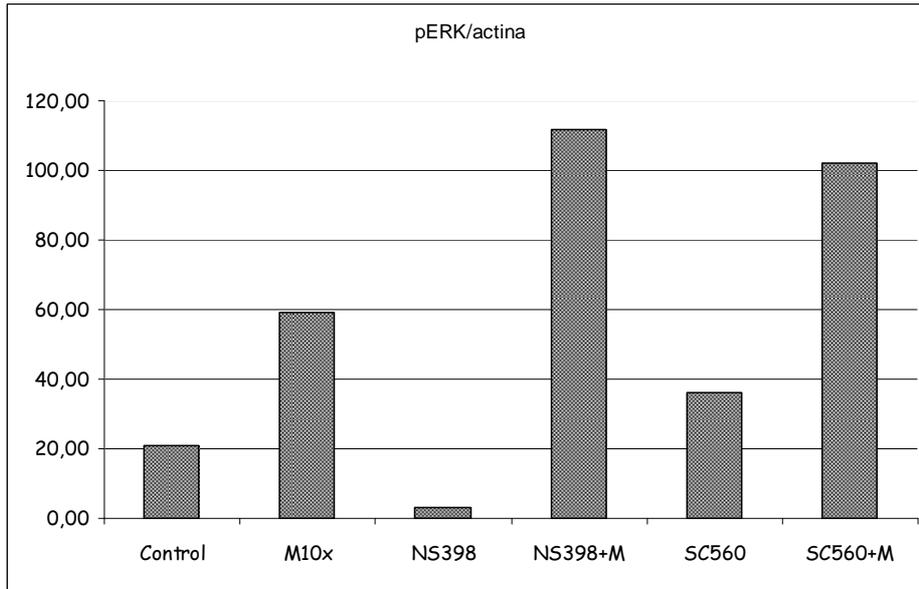
B.4 Evaluación del efecto del estímulo osmótico en la vía de señalización de las MAP quinasas en presencia de Inhibidores de COXs:

Para evaluar si el efecto del estímulo osmótico en las vías de señalización de las MAP quinasas se encuentra afectado con el uso de inhibidores de COXs, para esta parte del estudio se compara el uso de los inhibidores sin estimular las células con las que se les adiciona Manitol al 10%. El western blot muestra que en cuanto a la fosforilación de Akt cuando se incubaba previamente el NS-398 esta disminuye con respecto al control y al Manitol solo, en cambio con el uso de SC-560 no se ve afectada la fosforilación. Para p-ERK la presencia de los antagonistas aumenta la fosforilación de esta MAP quinasa luego de la activación con Manitol. En cuanto a p38 y p-JNK la fosforilación esta incrementada con el SC-560 junto con el Manitol y disminuye con el NS-398, tal y como se observa en el blot y las gráficas de densitometrías de la figura 22.

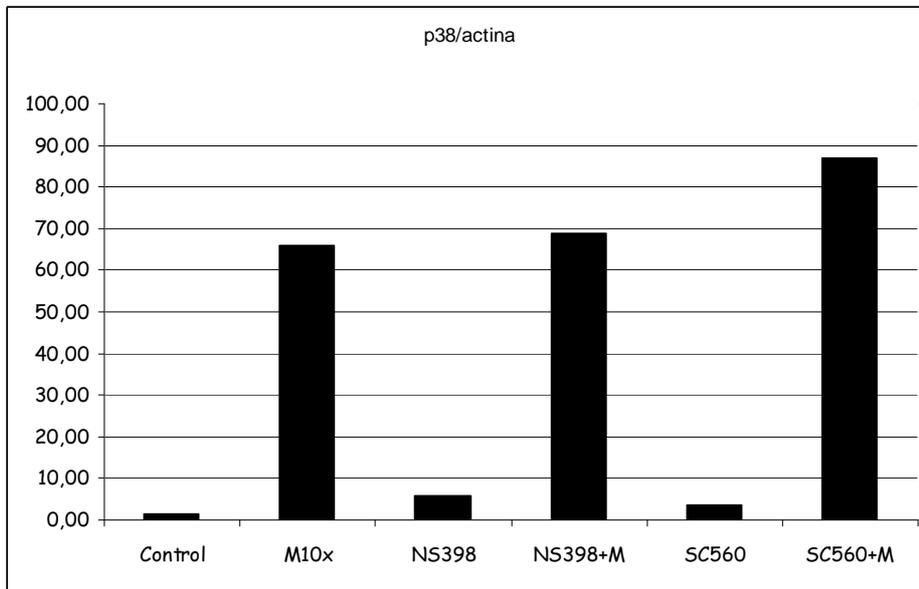
A.



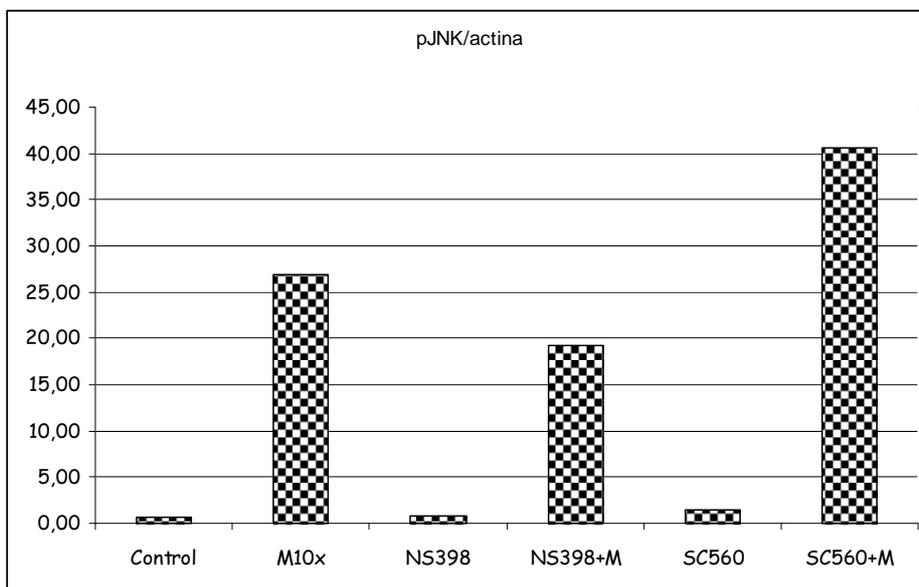
B.



C.



D.



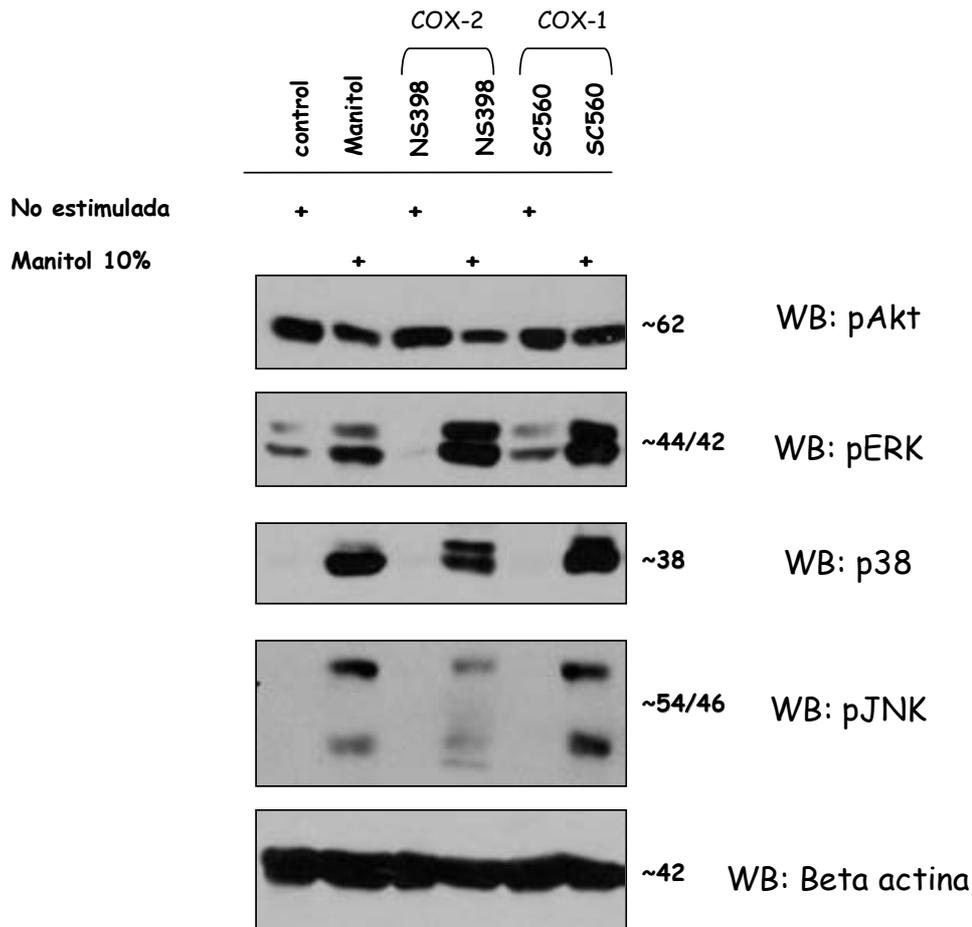


Fig. 22 Evaluación del estímulo osmótico en la vía de las MAP quinasas en presencia de inhibidores de COXs. 0.5×10^6 células LAD2 por punto de activación se incuban por 10 minutos con: SC-560 (10nM) el inhibidor selectivo de COX-1, NS-398 (10 μ M) el inhibidor selectivo de COX-2, luego se adiciona a estos puntos el Manitol al 10% 15 minutos a 37°C. Posteriormente las células se lisan, con estos lisados se corre el gel de SDS-Page al 10% y se transfiere a una membrana de PVDF, que va ser incubada con los anticuerpos anti-Akt fosforilado, anti-ERK fosforilado, anti-p38 fosforilado, anti-pJNK fosforilado, y el control de carga es la β -actina. Densitometrías de (A) pAkt/actina, (B) pERK/actina, (C) p38/actina, (D) pJNK/actina.

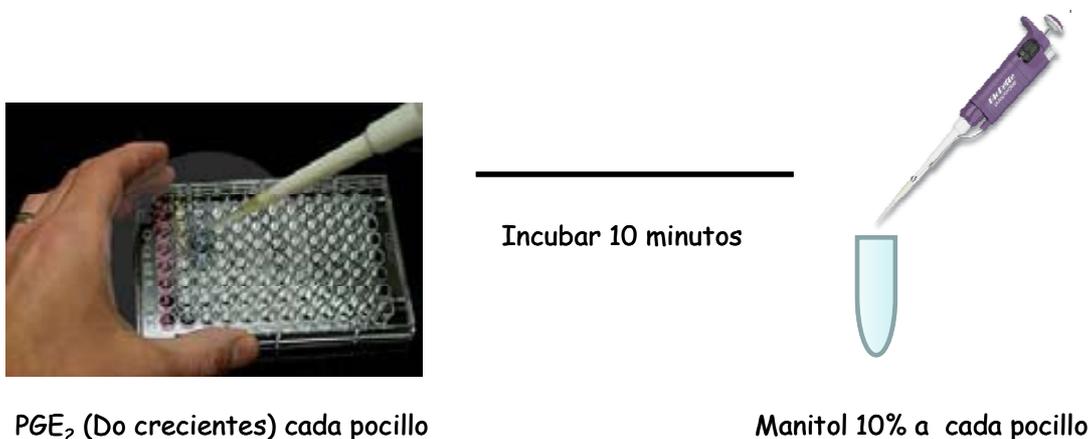
En las gráficas de densitometrías se observa que el al inhibir con NS-398 (inhibidor de COX-2) y posteriormente incuban con Manitol aumenta la fosforilación de ERK y disminuye la de pJNK, y sin cambios importantes en la fosforilación de p38 con respecto al Manitol. Para el caso del SC-560 (inhibidor de COX-1) junto con Manitol destaca en incremento de la fosforilación de pERK, pJNK y p38, con respecto al Manitol. Un aspecto importante a tomar en cuenta es que la vía de las MAP quinasas señalizan la inducción de la expresión de COX-2 vía activación del factor nuclear κ -B (NF κ -B) en situaciones de inflamación.

C. Efecto de la activación del mastocito por cambios osmóticos modulados en respuesta a Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Al inhibir las COXs y activar el mastocito con Manitol se observó un efecto consistente en la desgranulación en el ensayo de β -hex, visto en la figura 23 del apartado anterior, por lo que la pregunta en este apartado es si al utilizar un metabolito del AA como es la PGE₂ que tiene múltiples efectos funcionales aparentemente opuestos, ya que se propone que tiene acciones pro-inflamatorias como antiinflamatorias, en especial en las vías aéreas (Okano et al, 2009), podremos modular la activación del mastocito ante los cambios de osmolaridad. Para esto primero se determina que acciones tiene la PGE₂ en el mastocito cuando se administra previamente al Manitol.

C.1 Determinación de la Dosis de Prostaglandina E₂ capaz de modular la activación del mastocito por cambios osmóticos.

Para evaluar como responde el mastocito a la administración de PGE₂ frente a cambios osmóticos, se realiza una curva dosis respuesta en la que se incuban dosis crecientes de PGE₂ desde 0.03 μ M hasta 10 μ M durante 10 minutos, luego de este tiempo se añade Manitol 10% y se incuba por 30 minutos a 37°C. Se realiza el ensayo de β -hex. Cómo se muestra en el siguiente esquema:



El resultado de la curva dosis respuesta es que a una concentración 1 μ M se observa la mayor disminución en el porcentaje de liberación de β -hex (Fig 20). Esta dosis es la que se utiliza en el resto de los ensayos. El resultado obtenido sirve para caracterizar la respuesta que exhibe el mastocito ante la administración de PGE₂ frente a la activación osmótica, de manera que el siguiente paso es caracterizar que receptores a los que ésta se une son los responsables de los efectos obtenidos. En la gráfica se observa que las dosis de 0.1 μ M a 1 μ M la disminución en la liberación de β -hex son

similares y significativamente diferentes con respecto al Manitol, dosis mayores de PGE₂ aumenta el porcentaje de liberación.

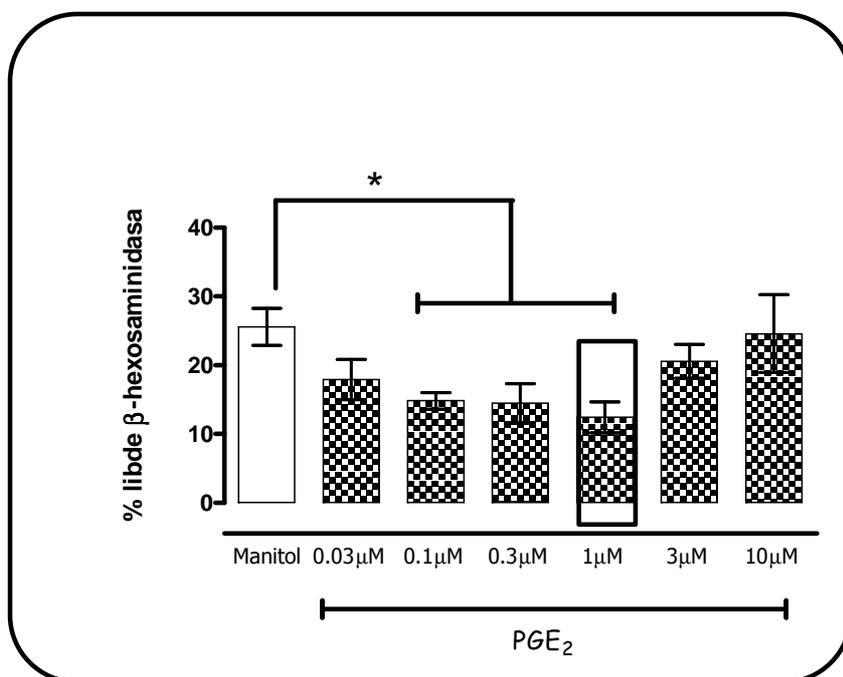


Fig. 23 Curva Dosis Respuesta de Prostaglandina E₂. 0.6×10^5 células por punto de activación son pretratadas con dosis crecientes en progresión logarítmica (0.03 μ M-10 μ M) de PGE₂ por 10 minutos y luego se incuban con Manitol al 10%, por 30 minutos. Posteriormente se realiza el ensayo de β -Hexosaminidasa que se expresa como el porcentaje de liberación máxima del sobrenadante con respecto al lisado de las células con tritón. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una n=3 experimentos independientes.* estadísticamente significativo $p < 0.05$.

Tal como se describe anteriormente, la PGE₂ se une a receptores de membrana tipo Proteína G, que se encuentran distribuidos en la membrana de los diferentes tejidos, igualmente la población de receptores de prostanoïdes es diversa y la cantidad de estos determinará cual será la respuesta que predomine al final. Para caracterizar la población de receptores se realiza un estudio farmacológico con el uso de antagonistas de los receptores de PGE₂, se utiliza la PCR a tiempo real (RT-PCR) para cuantificar de manera relativa cual es la población predominante, y por último mediante la técnica de western blot se compara la línea celular LAD2 con el cultivo primario de mastocitos HuMCs CD34+, con el uso de anticuerpos específicos para cada receptor.

C.2 Caracterización de la expresión de receptores de Prostaglandina E₂ en el mastocito

C.2.1 mediante PCR a tiempo real (RT-PCR).

La PGE₂ tiene múltiples efectos fisiológicos que son a su vez opuestos, dependiendo del tejido; la diferencia de estos efectos son evidencia funcional importante de la existencia de múltiples receptores. Mediante la técnica de PCR a tiempo real se determina el perfil de receptores EP en el ARN mensajero expresado en la línea celular LAD2. Los resultados obtenidos se normalizan con la β -actina. El resultado de esta cuantificación es que la línea LAD2 expresa los receptores EP₂, EP₃ y EP₄, el receptor EP₁ no lo expresa, y el orden decreciente de la población de receptores es EP₃>EP₄>EP₂, tal como se observa por el *fold increase* en la figura 24.

Estos resultados expresan la presencia de receptores de prostanoides (EP) en mastocitos en condiciones basales, es decir, las células no era estimulada.

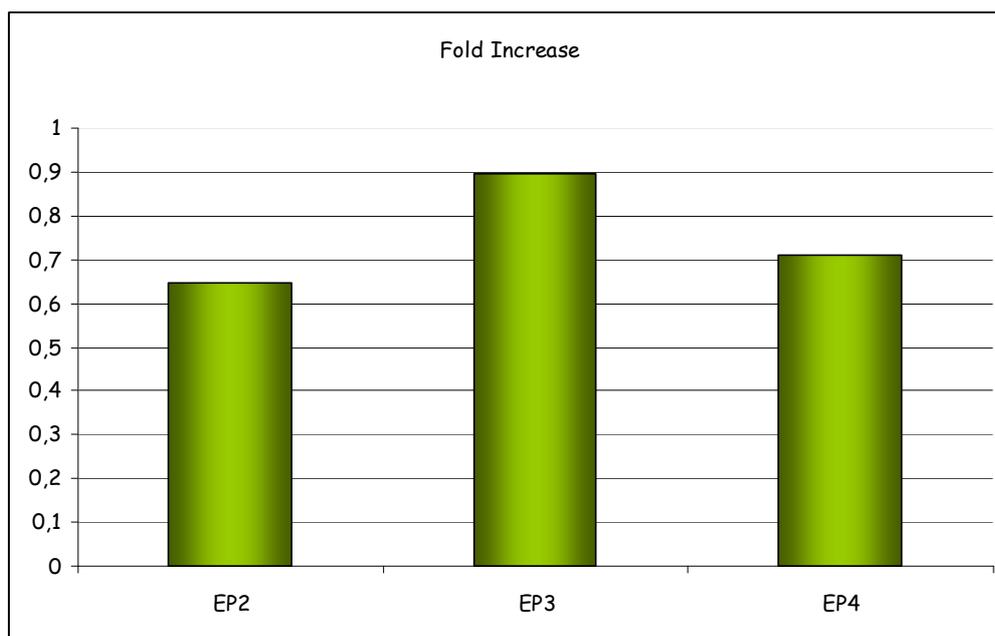


Fig. 24 Caracterización de los receptores de EP en células LAD2 por RT-PCR. Con 1×10^6 células LAD2 se hace la extracción de ARN y luego pasarlo a ADNC, se realiza la caracterización por PCR a tiempo real mediante el uso de LightCycler® FastStar DNA Master SYBR Green (Roche). Normalizado con β -actina como gen constitutivo.

C.2.2 Mediante Western Blot.

Se utiliza la técnica de Western Blot para la determinación de la expresión de receptores de PGE_2 en el cultivo primario de mastocitos provenientes de sangre periférica (HuMCs CD34+) y se compara con la línea de mastocitos LAD2, utilizando anticuerpos policlonales para cada receptor, las células se encuentran en estado basal, por lo que la expresión de los receptores es sin ningún estímulo.

C.2.2a Western Blot del Receptor EP_1

El receptor EP_1 es una proteína de 402 amino ácidos con una molecular de 42000 aproximadamente, se expresa en una variedad de tejidos, pero en el mastocito procedente de cultivo primario de progenitores al igual que la línea LAD2 no se detecta presencia de este receptor tal cómo se aprecia en la figura 25 del western blot en el peso de 42kDa no hay señal.

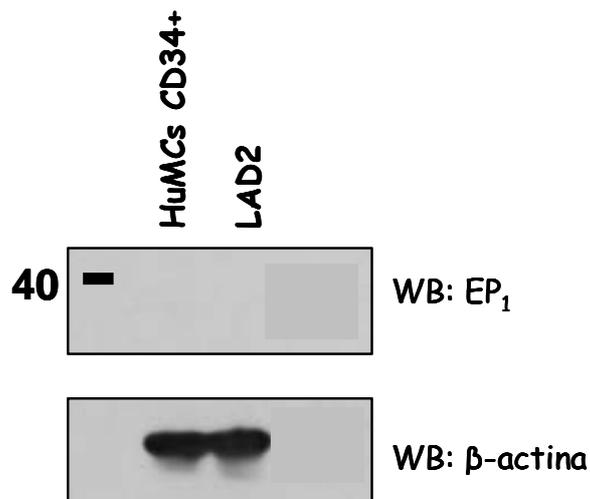


Fig. 25 Western Blot de la expresión de receptor EP_1 en LAD2 y HuMCs CD34+. En este estudio se utilizan 0.5×10^6 células por punto, se lisan y se corre el gel SDS-PAGE al 10% y se transfiere a una membrana de PVDF, que se incuba con el anticuerpo anti- EP_1 y β -actina como control de carga.

C.2.2b Western Blot del Receptor EP₂

El receptor EP₂ es una proteína con 358 amino ácidos y una masa molecular de 40000. En el blot se detectan bandas a los 53kDa, pero también dependiendo del grado de modificaciones post-translacionales del ARN mensajero del receptor se pueden detectar bandas a los 52 o 65kDa. Ambos tipos celulares presentan igual patrón de expresión del receptor EP₂ en el blot y la carga es muy similar tal como se aprecia con la β-actina (Fig 26).

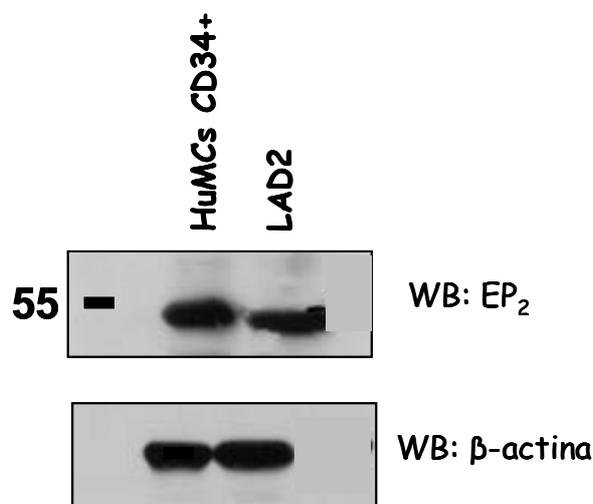


Fig. 26 Western Blot de la expresión de receptor EP₂ en LAD2 y HuMCs CD34+. En este estudio se utilizan 0.5×10^6 células por punto, se lisan y se corre el gel SDS-PAGE al 10% y se transfiere a una membrana de PVDF, que se incuba con el anticuerpo anti-EP₂ y β-actina como control de carga.

C.2.2c Western Blot del Receptor EP₃

El receptor EP₃ tiene la característica de expresar múltiples isoformas por los splicing alternativos que se deben a cambios en la longitud y secuencia de la cola del C-terminal, por lo que el mecanismo de transducción de señales varía dependiendo de la isoforma que se exprese. El receptor EP₃ se detecta a 65 o 52kDa dependiendo del grado de modificaciones post-translacionales de este. En este blot en las LAD2 se obtienen dos bandas una por debajo del peso de 55kDa y otra por arriba, de igual intensidad, en el caso de las HuMCs CD34+ la banda del peso menor de 55kDa es menos intensa que la ubicada por arriba de este peso, la carga total con β-actina es muy similar (Fig. 27).

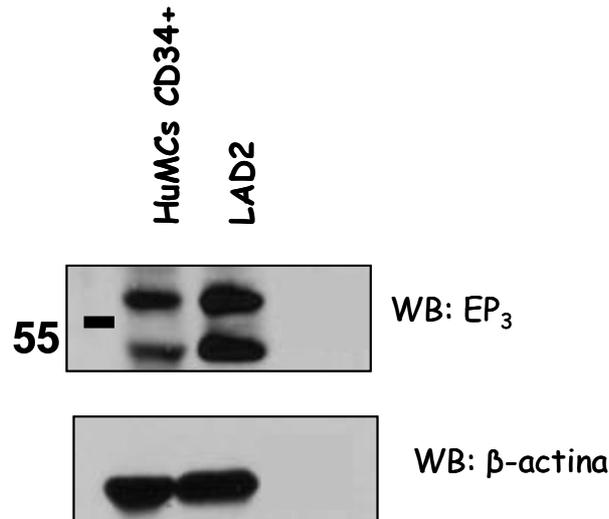


Fig. 27 Western Blot de la expresión de receptor EP₃ en LAD2 y HuMCs CD34+. En este estudio se utilizan 0.5x10⁶ células por punto, se lisan y se corre el gel SDS-PAGE al 10% y se transfiere a una membrana de PVDF, que se incuba con el anticuerpo anti-EP₃ y β-actina como control de carga.

C.2.2d Western Blot del Receptor EP₄

El receptor EP₄ esta ampliamente distribuido, se expresa en mayor número en los tejidos comparado con el EP₂, además tiene particularidad de poseer una cola citoplasmática larga que lo hace susceptible a desensibilización por fosforilación del agonista. Este receptor regula los niveles y estabilidad del ARN mensajero de COX-2. El mecanismo de señalización es a través de la Proteína Gs que aumenta el AMPc. En el blot se detectan bandas aproximadamente a 55kDa, pero también es susceptible a modificaciones post-translacionales que produce la presencia de otras bandas que se observan en la figura 28.

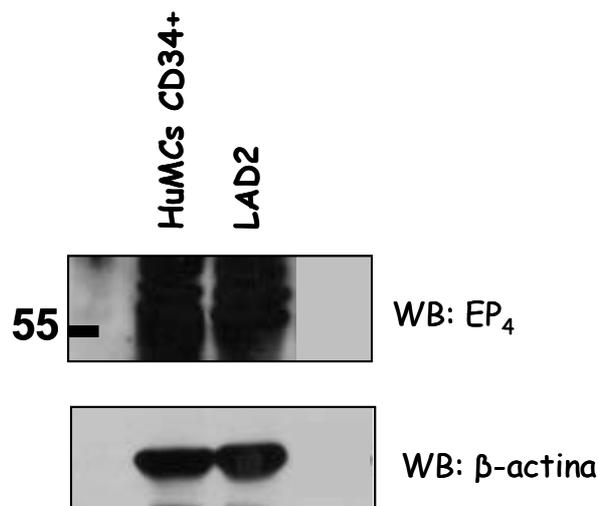
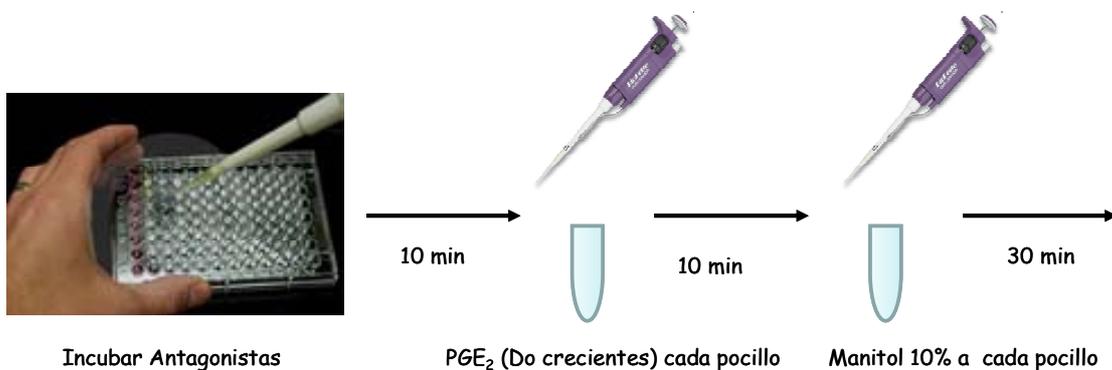


Fig. 28 Western Blot de la expresión de receptor EP₄ en LAD2 y HuMCs CD34+. En este estudio se utilizan 0.5x10⁶ células por punto, se lisan y se corre el gel SDS-PAGE al 10% y se transfiere a una membrana de PVDF, que se incuba con el anticuerpo anti-EP₄ y β-actina como control de carga.

Por la técnica de Western Blot se observa que en los dos tipos de mastocitos el patrón de expresión de receptores es similar, y es otra herramienta que confirma los resultados obtenidos tanto por RT-PCR, los receptores que se expresan son el EP₂, EP₃ y EP₄ y el EP₁ no se detecta para estos tipos de mastocitos por las técnicas utilizadas.

C.3 Modulación de los efectos de Prostaglandina E₂ en el mastocito con el uso de Antagonista de receptores de EP en la activación osmótica.

La clasificación farmacológica de los receptores de prostanoïdes fue desarrollada en la base de que cada receptor preferentemente reconoce una de las mayores prostaglandinas naturales. En el caso de este estudio se realiza con los siguientes antagonistas selectivos; AH6809 (10µM) bloquea el receptor EP₁ y EP₂ (Chan et al, 2000), L826266 (30µM) bloquea el receptor EP₃ (Claudino et al, 2006) AH23848 (10µM) que bloquea el receptor EP₄ (Davis & Sharif, 2000). Se realiza nuevamente la curva dosis respuesta de PGE₂, pero previamente se incuban con los antagonistas, el esquema de este ensayo es el uso combinados de los bloqueadores de receptores de prostanoïdes en el que se deja un receptor sin bloquear y que permite observar el efecto de PGE₂ sobre el que queda libre. Con los datos de la RT-PCR se describe qué receptores están presentes en la línea celular LAD2, y con la ayuda de los antagonistas de los receptores se determina la acción de estos receptores al activarlos ya sea con el agonista (PGE₂) o con el estímulo osmótico (Manitol). Los datos se describen para cada receptor en los siguientes apartados siguiendo el siguiente esquema



C.3.1 Efecto del Manitol y la Prostaglandina E₂ en el Receptor EP₄

En este ensayo se incuban las células LAD2 con 10 μ M del antagonista de EP₂ (AH6809) y 30 μ M del antagonista EP₃ (L826266), por lo que el receptor que queda disponible es el EP₄. Luego de 10 minutos de la incubación se adiciona las dosis crecientes de PGE₂, se incuban por 10 minutos más y por último el Manitol por 30 minutos a 37°C, entonces se realiza el ensayo de β -hex, se observa que con todas las dosis de PGE₂ el efecto es de reducción del porcentaje de liberación con respecto al Manitol sólo y de manera significativa (Fig. 29). El receptor EP₄ está acoplado a la proteína Gs, con incremento del AMPc. La proteína tiene un peso de aproximadamente 53kDa, está ampliamente distribuido y se expresa más que el receptor EP₂. El receptor EP₄ posee una cola citoplasmática muy extensa en el C-terminal y contiene 38 residuos de serina y treonina que sirven como sitios de múltiples fosforilaciones, este hecho hace de este receptor susceptible a desensibilización por fosforilación dependiente del agonista (Nishigaki et al, 1996).

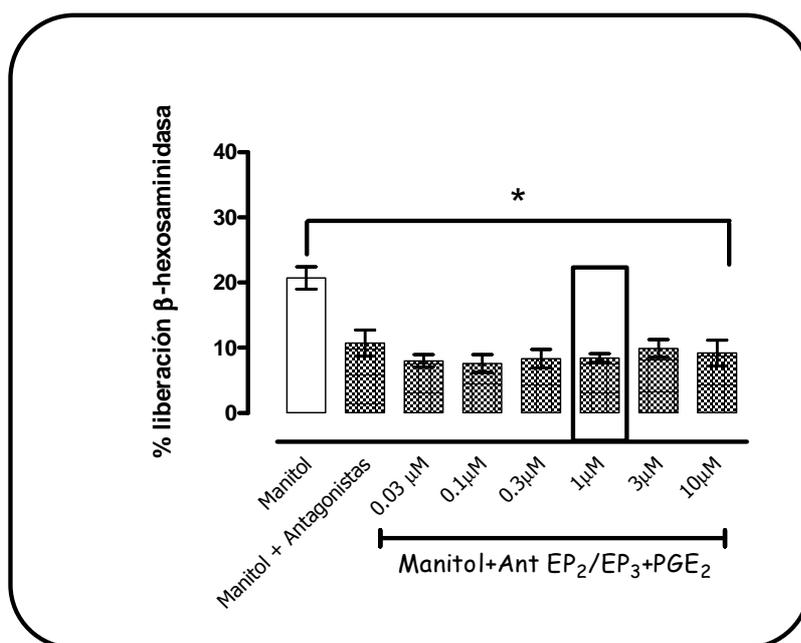


Fig. 29 Curva Dosis Respuesta de Prostaglandina E₂ en presencia de los antagonistas del receptor EP₂ (AH6809) y del receptor EP₃ (L826266). Para evaluar la respuesta del receptor EP₄ en la activación osmótica inducida por Manitol. Se realiza el ensayo de β -hex que se expresa como el porcentaje de liberación máxima del sobrenadante con respecto al lisado de las células con tritón. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una n=3 experimentos independientes. (*Diferencia significativa de $p < 0.001$ con respecto al Manitol)

C.3.2 Efecto del Manitol y la Prostaglandina E₂ en el Receptor EP₃

Con el esquema descrito en el que se bloquean dos receptores de prostanoideos para dejar libre uno, se combina el antagonista del receptor EP₂ el AH6809 a 10µM y el antagonista del receptor EP₄ el AH23848 a 10µM también, y se tiene el receptor EP₃ para observar la respuesta frente al estímulo osmótico. Generalmente este receptor esta acoplado a proteína Gi el cual inhibe la generación de AMPc, con movilización de calcio. En este caso particular en la curva dosis respuesta de PGE₂, el receptor EP₃ al activarse reduce la liberación de β-hex en todas las dosis excepto a 10µM donde se ve que la liberación es comparable al manitol, las otras dosis la diferencia es significativa (Fig 30).

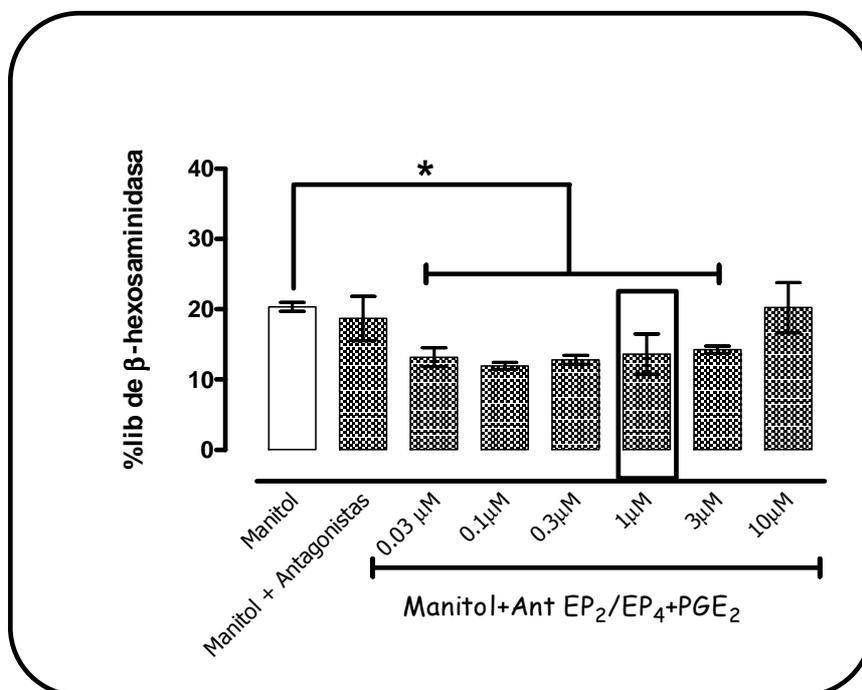


Fig. 30 Curva Dosis Respuesta de Prostaglandina E₂ en presencia de los antagonistas del receptor EP₂ (AH6809) y del receptor EP₄ (AH23848). Para evaluar la respuesta del receptor EP₃ en la activación osmótica inducida por Manitol. Se realiza el ensayo de β-hex que se expresa como el porcentaje de liberación máxima del sobrenadante con respecto al lisado de las células con tritón. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una n=3 experimentos independientes. (*Diferencia significativa de p<0.05 con respecto al Manitol)

C.3.3 Efecto del Manitol y la Prostaglandina E₂ en el Receptor EP₂

El receptor EP₂ se expresa en niveles menores en la mayoría de los tejidos y puede inducirse su expresión en respuesta a estímulos inflamatorios (Goodman & Gilman, 2006). Este receptor al igual que el EP₄ esta acoplado a proteína Gs, con el consiguiente aumento de la concentración de AMPc. Es un receptor que no es susceptible a desensibilización ya que su cola citoplasmática en el C-terminal es corta.

Se bloquea previamente los receptores EP₃ con 30μM de L826266 y el receptor EP₄ con 10μM del AH23848, se incuban por 10 minutos y se adicionan las dosis crecientes de PGE₂, transcurridos 10 minutos adicionales se incuban con el Manitol por 30 minutos a 37°C. Se realiza el ensayo de β-hex y los porcentaje de liberación son menores que el Manitol, pero el que muestra una mayor inhibición es la dosis de 1μM y que es estadísticamente significativo con un p<0.05 (Fig. 31).

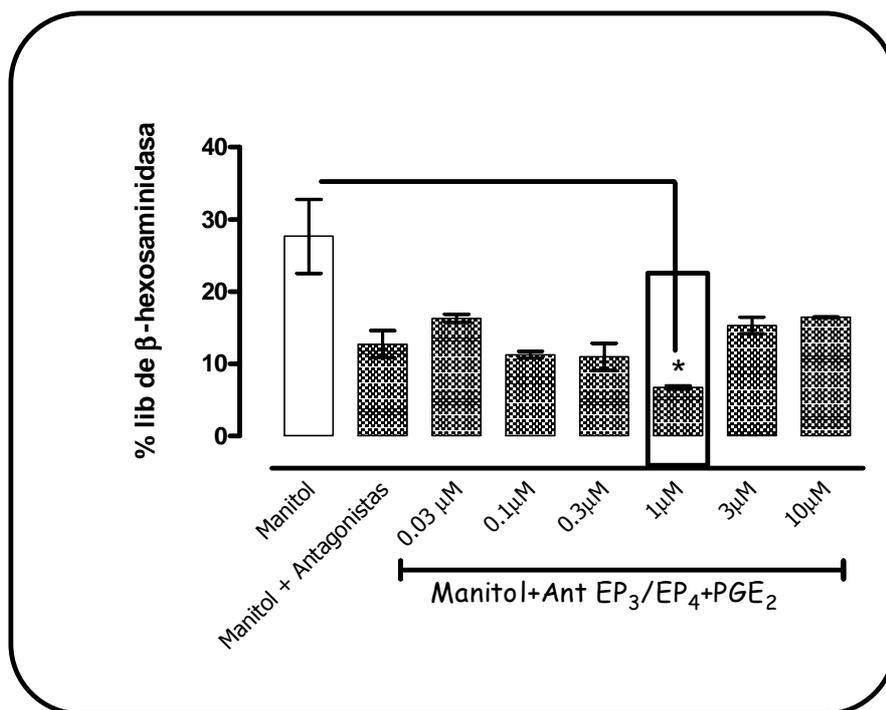


Fig. 31 Curva Dosis Respuesta de Prostaglandina E₂ en presencia de los antagonistas del receptor EP₃ (L826266) y del receptor EP₄ (AH23848) Para evaluar la respuesta del receptor EP₂ en la activación osmótica inducida por Manitol. Se realiza el ensayo de β-hex que se expresa como el porcentaje de liberación máxima del sobrenadante con respecto al lisado de las células con tritón. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una n=3 experimentos independientes. (* Diferencia significativa p<0.05 en la dosis de 1μM de PGE₂ con respecto al Manitol).

En resumen, los mastocitos de la línea LAD2 expresan los receptores EP₂, EP₃ y EP₄, con la ayuda de antagonistas farmacológicos específicos se ha determinado que los receptores son capaces de reducir la liberación de β-hex de manera variable dependiendo de la dosis de PGE₂. La dosis de PGE₂ que muestra mejor efecto en la reducción del porcentaje de liberación es la de 1μM. Los receptores EP₂ y EP₄ están acoplados a Proteína Gs, con aumento de AMPc y por lo tanto reducción de la activación del mastocito, el receptor EP₄ se expresa más ampliamente que el EP₂, pero el primero es más susceptible a desensibilización, en cambio el EP₂ tiene la

particularidad que no se desensibiliza y aumenta su expresión en caso de un proceso inflamatorio. El receptor EP₃ también reduce la liberación de β -hex, pero es una reducción que no es significativa, y a la dosis mayor de PGE₂ es de la misma magnitud que el Manitol, además que el mecanismo de señalización principal es a través de la proteína Gi, con reducción del AMPc.

C.5 Efecto de la Prostaglandina E₂ y Antagonistas de los receptores de EP en la activación osmótica inducida por Manitol en mastocitos obtenidos de cultivos primarios.

Los efectos observados con la línea LAD2 muestran que el estímulo osmótico es capaz de inducir liberación de β -hex y que al utilizar antagonistas de los receptores de EP esta respuesta varía de acuerdo al mecanismo de señalización del receptor que es activado por PGE₂. Para validar los datos que se han obtenido con las LAD2, se realiza la activación por un lado de mastocitos obtenidos a partir de pulmón de pacientes sometidos a cirugía torácica (HMCL) y por otra parte los mastocitos diferenciados a partir de células pluripotenciales CD34+ (HuMCs CD34+).

En la figura 32 está representada la activación en mastocitos humanos CD34+ (HuMCs CD34+), el estímulo osmótico induce más del 30% de liberación de β -hex y cuando se incubaba conjuntamente con la PGE₂ (1 μ M) ésta activación es mayor. Cuando se administra previamente los antagonistas selectivos de los receptores EP, se observa que los receptores EP₂ y EP₄ producen disminución del porcentaje de liberación de β -hex significativo con respecto al Manitol, en cambio al activar el receptor EP₃, aunque hay disminución del porcentaje de liberación no hay diferencias significativas con respecto al estímulo osmótico.

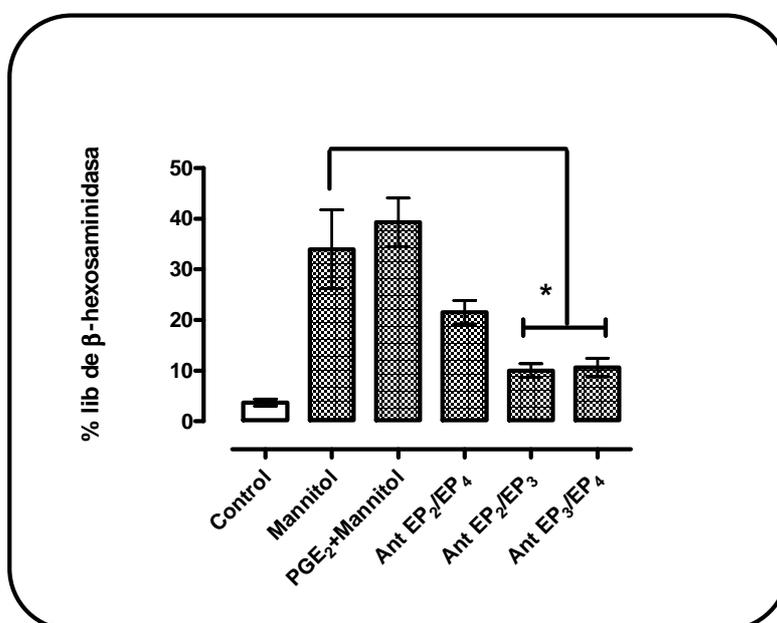


Fig. 32 Ensayo de β -hexosaminidasa con mastocitos humanos CD34+ (HuMCs CD34+) Se utilizan 2×10^4 células por condición. Se incuban con los respectivos antagonistas selectivos por 10 minutos, luego con la PGE₂ por otros 10 minutos más y finalmente se activan con Manitol 10% por 30 minutos a 37°C. Finalmente se centrifugan y se recoge por un lado los sobrenadantes y por otro se lisan las células con tritón. La liberación de β -hex se expresa como el porcentaje de liberación máxima del sobrenadante con respecto al lisado de las células con tritón. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una n=3 experimentos independientes. * Diferencia significativa p<0.05 con respecto al Manitol.

En la Figura 33 se representan los resultados obtenidos de la activación de mastocitos humanos provenientes de pulmón (HMCL) en el ensayo de liberación de β -hex, el porcentaje de activación con Manitol es del 23%, el de PGE₂ más Manitol es de 19%, al activar el receptor EP₃ se observa que el porcentaje de liberación es de la misma magnitud que el Manitol, en cambio con los receptores EP₂ y EP₄ hay disminución en la liberación de β -hex, sin embargo estas diferencias no son significativas.

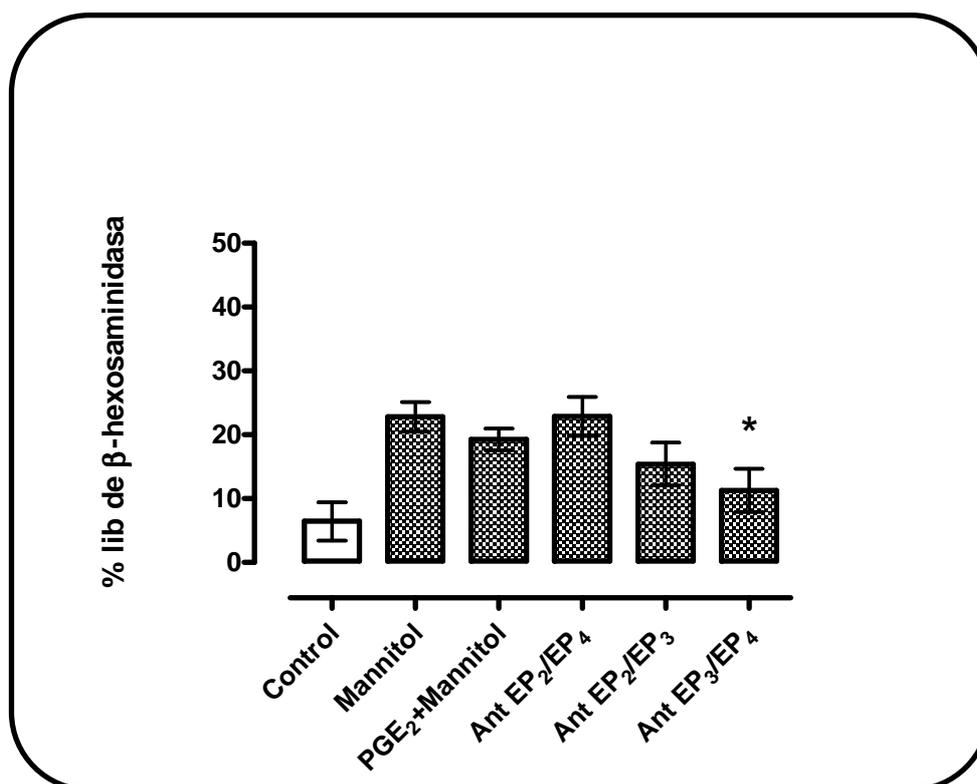


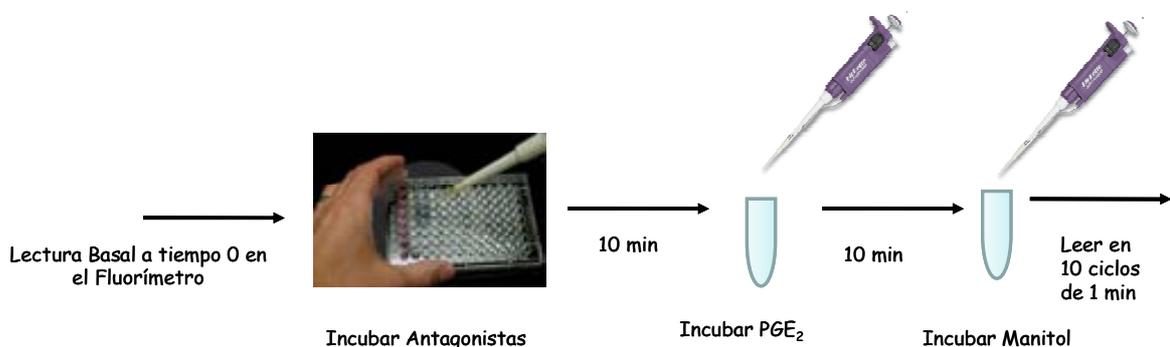
Fig. 33 Ensayo de β -hexosaminidasa con mastocitos humanos provenientes de pulmón (HMCL) Se utilizan 2×10^4 células por condición. Se incuban con los respectivos antagonistas selectivos por 10 minutos, luego con la PGE₂ por otros 10 minutos más y finalmente se activan con Manitol 10% por 30 minutos a 37°C. Finalmente se centrifugan y se recoge por un lado los sobrenadantes y por otro se lisan las células con tritón. La liberación de β -hex se expresa como el porcentaje de liberación máxima del sobrenadante con respecto al lisado de las células con tritón. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una n=3 experimentos independientes.

Al utilizar mastocitos provenientes de cultivo primarios en el ensayo de β -hex el resultado de la activación con Manitol es muy parecido al observado con las células LAD2. En los mastocitos provenientes de pulmón cuando el receptor EP₃ es activado no hay disminución del porcentaje de liberación de β -hex, caso contrario con los puntos en que se activan el EP₂ y EP₄, en los que la disminución es estadísticamente significativa, como es el caso de los HuMCs CD34+. Por lo que el resto de los experimentos que se presentan se enfocan en el efecto del estímulo osmótico y la PGE₂ en el receptor EP₃, ya sea cuando está disponible para activarlo o bloqueado.

C.6 Efecto de la Prostaglandina E₂ y Antagonistas de los receptores de EP con la activación osmótica inducida por Manitol en el flujo de Calcio.

El proceso de desgranulación o activación mastocitaria conlleva la movilización de calcio que en el proceso de exocitosis produce que los gránulos se fundan con la membrana celular liberando el contenido granular al espacio extracelular, previamente se observa que el Manitol es capaz de producir desgranulación y también aumento en el flujo de calcio, en este punto se quiere evaluar qué sucede cuando se adiciona la PGE₂ al bloquear el receptor EP₃. Se utiliza solo un antagonista ya que el protocolo de fluorescencia tiene la limitante de que con el paso del tiempo se produce quelación del Ca²⁺ con el fluorocromo. Se escoge el antagonista del receptor EP₃ ya que permite evaluar la acción de los receptores EP₂ y EP₄ que tienen el efecto de disminuir la liberación de β-hex y así se puede correlacionar si parte de este efecto se deba al flujo de calcio ya que la presencia de este ión es primordial para procesos como la exocitosis al igual que otros mecanismos evaluados anteriormente como la polimerización de actina, por lo que es importante determinar este parámetro.

Para este ensayo se toman 2x10⁵ células LAD2 por punto de activación, que se incuban por 30 minutos a 37°C con FLUO 4/AM, y después de lavar las células se hace una lectura basal de fluorescencia. Posterior a la lectura basal se pretrata el grupo de células con 30μM de L826266 (antagonista EP₃) por 10 minutos y luego 1μM de PGE₂, después de 10 minutos más de incubación se adiciona el Manitol y se inicia la lectura de fluorescencia en 10 ciclos de 1 minuto (Fig. 32) siguiendo el esquema de trabajo que se presenta a continuación.



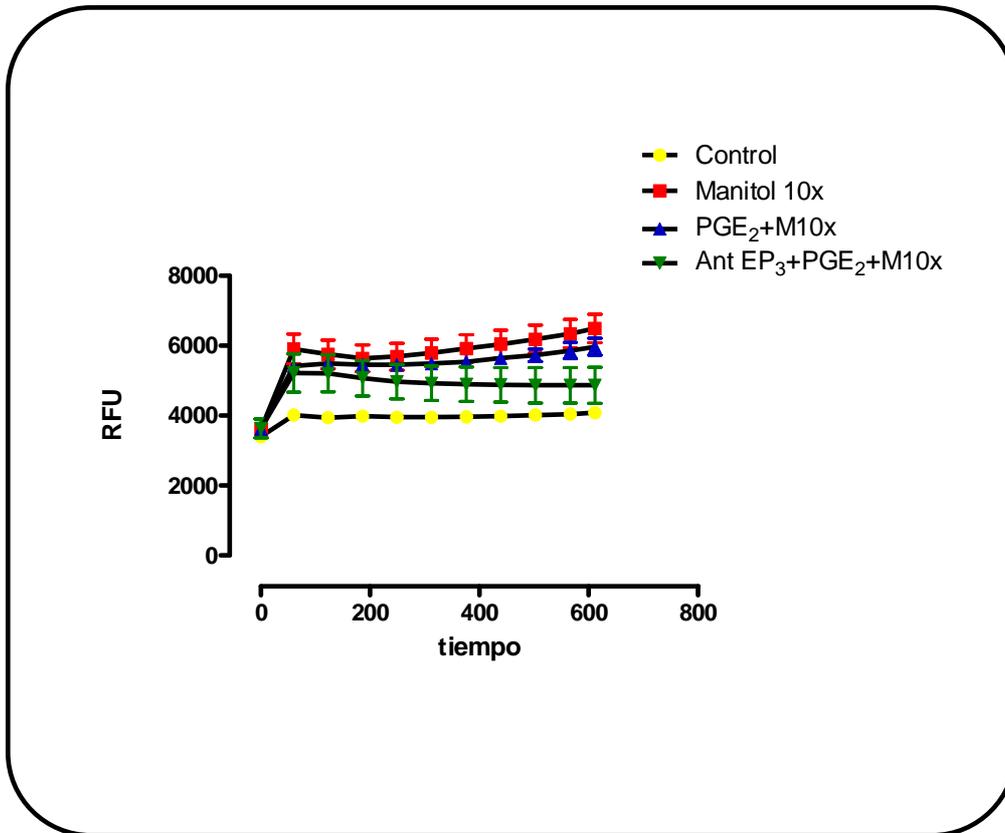


Fig. 34 Determinación del flujo de calcio por Fluorimetría. En este estudio se utilizan 2×10^5 células LAD2, por punto de activación. Las células se van a incubar con la sonda FLUO 4/AM por 30 minutos a 37°C . Luego de esto se centrifugan y se lavan colocándolas en placas de 96 pocillos y luego de tomar la lectura basal de los grupos se incuban con los tratamientos de agonistas y antagonistas por 10 minutos cada uno y finalmente Manitol al 10%. Se realiza la lectura de 10 ciclos de 1 minuto. Los resultados se expresan como las unidades relativas de fluorescencia. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una $n=3$ experimentos independientes.

Posteriormente los grupos de tratamientos se incuban simultáneamente con Ionomicina $2.5\mu\text{M}$, para comprobar la calidad y validez del experimento. En la Figura 35 se observa que luego de administrar el ionóforo, la fluorescencia aumenta de forma marcada en todos los grupos, este movimiento de calcio se mide por espacio de 5 minutos y obtenemos las unidades relativas de fluorescencia (RFU).

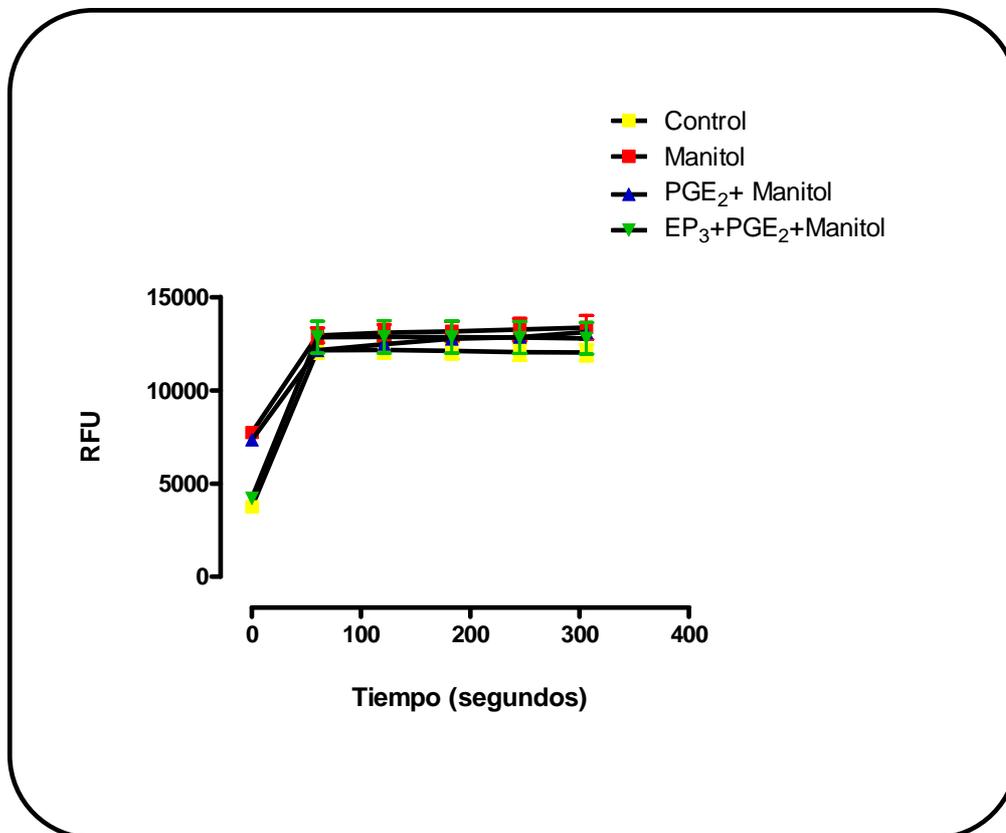
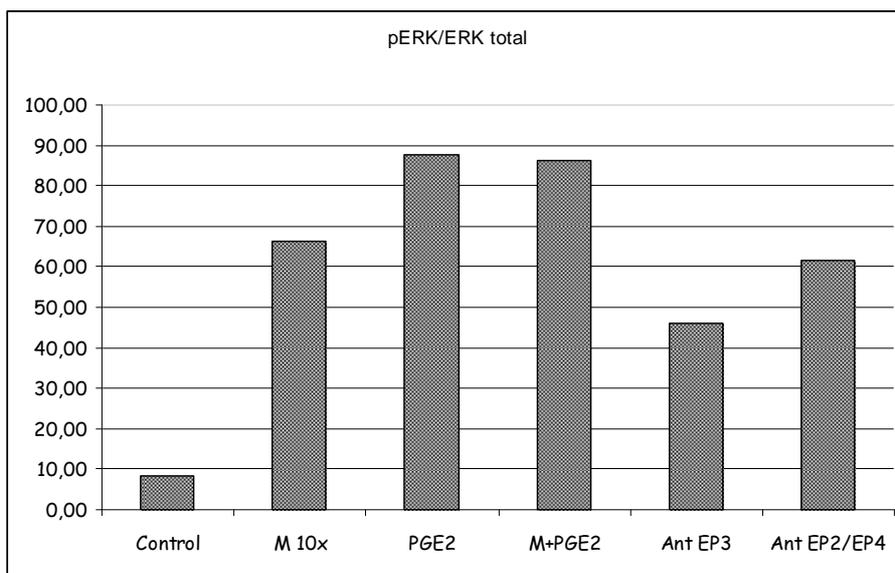


Fig. 35 Determinación del flujo de calcio con la administración de Ionomicina. Luego de transcurrido el tiempo de lectura del flujo de calcio con el Manitol y los grupos tratados, se incuban las células con Ionomicina 2.5 μ M, y se realiza la de 5 ciclos de 1 minuto. Los resultados se expresan como las unidades relativas de fluorescencia. Las mediciones se hicieron por triplicado y los datos representados son de una n=3 experimentos independientes.

C.7 Evaluación del Efecto de Prostaglandina E₂ y los Antagonistas de EP con la activación osmótica inducida por Manitol en las vías de las MAP quinasas

Para estudiar el papel de la PGE₂ y de los receptores de EP frente al estímulo osmótico en las vías de las MAP quinasas, se realiza la técnica de western blot con las líneas LAD2 y HMC-1. Se utiliza 0.5x10⁶ de células por punto de activación de los tratamientos que se representan en los blots y el tiempo de activación es de 15 minutos. Los tratamientos que se comparan son el control o no estimuladas, Manitol 10%, PGE₂ (1uM), Manitol más PGE₂ (1uM), L826266 más PGE₂ y Manitol, AH6809 (10µM) y AH23848 (10µM) más PGE₂ y Manitol. En la figura 36 se observa que la fosforilación de pAkt y pERK disminuye cuando los receptores EP₂ y EP₄ son activados con respecto al Manitol o PGE₂ sola, en cuanto al receptor EP₃ cuando se activa aumenta claramente la fosforilación de pAkt, pero en el caso de pERK la fosforilación es menor al compararla con Manitol y PGE₂.

A.



B.

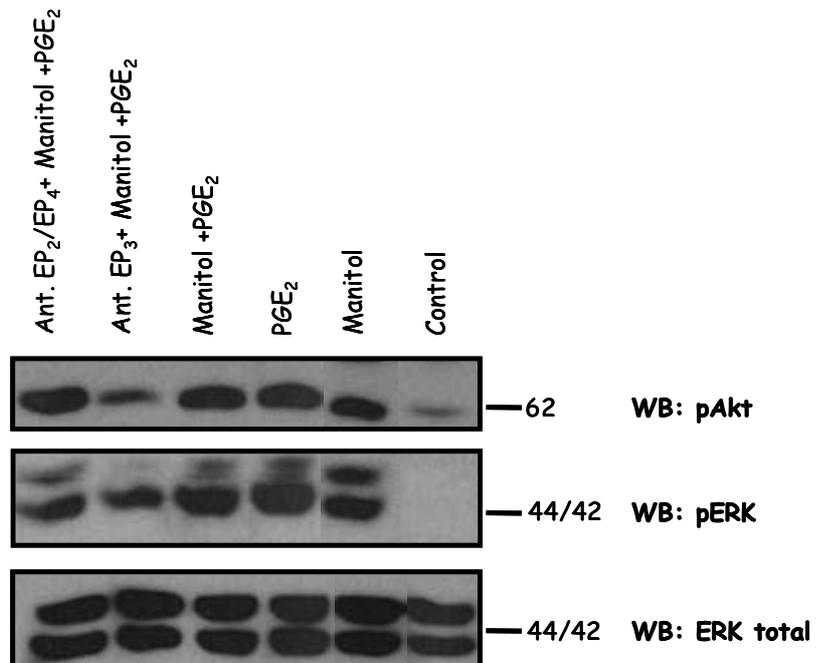
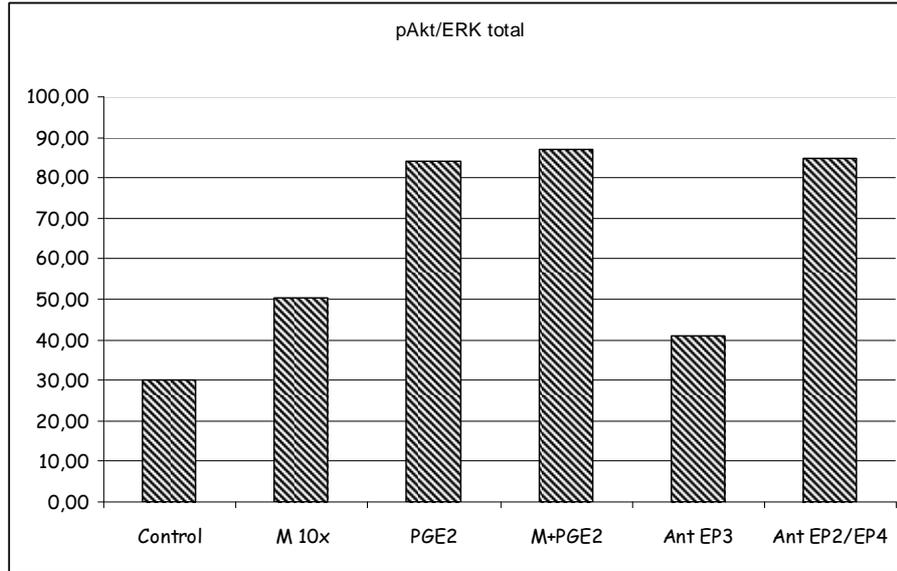
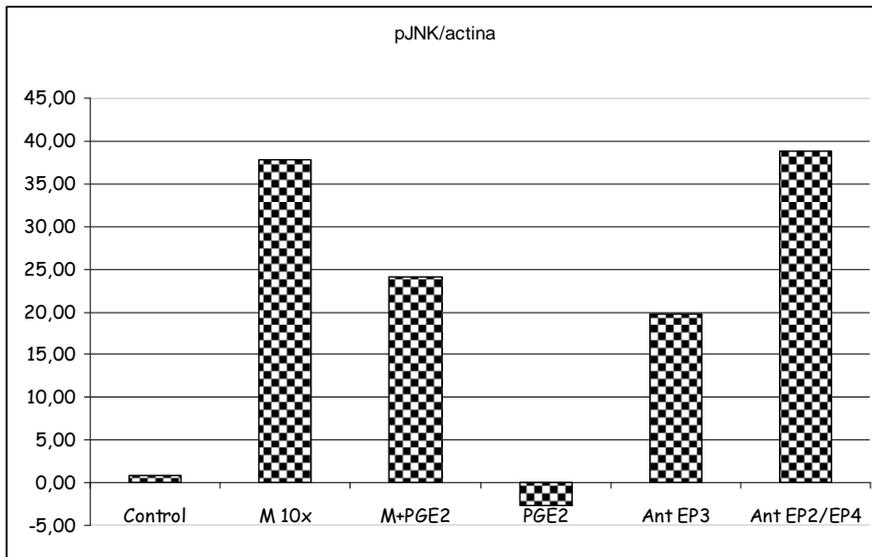


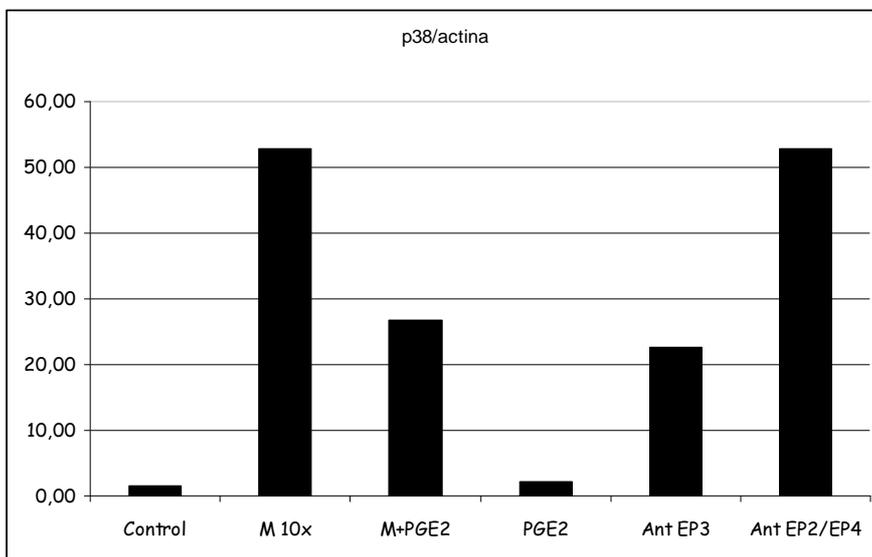
Fig. 36 El tratamiento con el antagonista de EP₃ disminuye la fosforilación de pAkt y pERK. A 0.5x10⁶ células LAD2 por punto, luego de los tratamientos y la activación con Manitol, se lisan y se corre el gel SDS-PAGE al 10%, se transfiere a una membrana de PVDF que se incuba con el anticuerpo pERK, pAkt y ERK total como control de carga.

Para MAP quinasas como pJNK y p38, el Manitol presenta un patrón de aumento de la fosforilación y que disminuye cuando se incubaba junto a PGE₂, en cambio la PGE₂ no activa estas vías. Con el antagonista EP₃ disminuye la fosforilación de ambas quinasas, y en el caso del uso combinado de los antagonistas EP₂ y EP₄ aumenta la fosforilación (Fig. 37) en los que se presentan las densitometrías y el blot correspondiente.

A.



B.



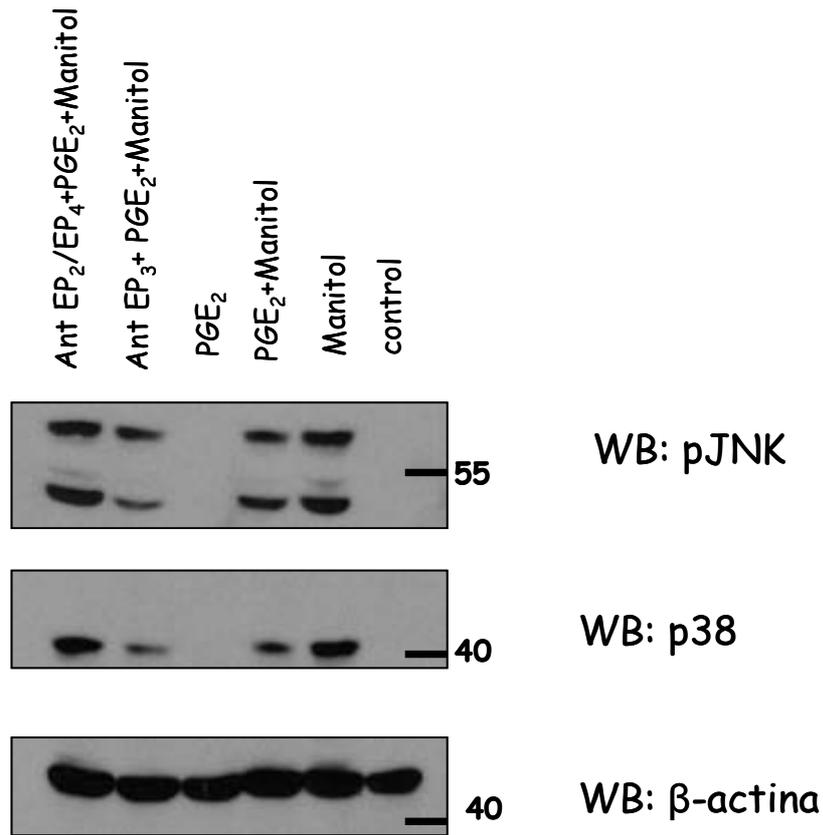
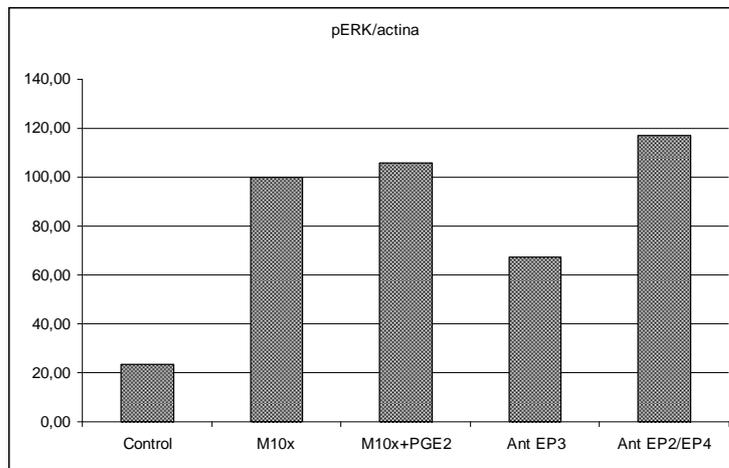


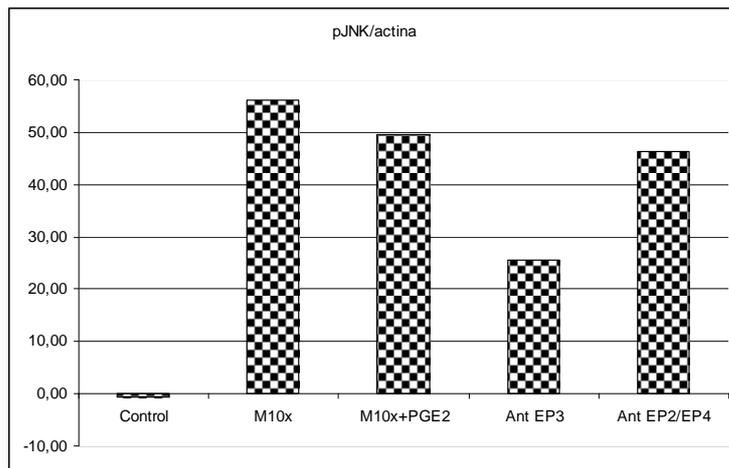
Fig. 37 El tratamiento con PGE₂ y con el antagonista de EP₃ disminuye la fosforilación de pJNK y p38. A 0.5×10^6 células LAD2 por punto, luego de los tratamientos y la activación con Manitol, se lisan y se corre el gel SDS-PAGE al 10%, se transfiere a una membrana de PVDF que se incuba con el anticuerpo pJNK, p38 y β -actina como control de carga.

El mismo estudio se realiza con HMC-1, pero en el caso de esta línea celular presenta fosforilación inespecífica que no se puede diferenciar entre los tratamientos. Para pERK, pJNK y p38 se observa el mismo patrón visto con las LAD2, en la que la fosforilación de pERK, pJNK y p38 disminuye cuando se bloquea el receptor EP₃, tal como se observa en la figura 36 donde se presentan las densitometrías junto con el blot de las MAP quinasas evaluadas en relación con el control de carga utilizado en este caso β -actina.

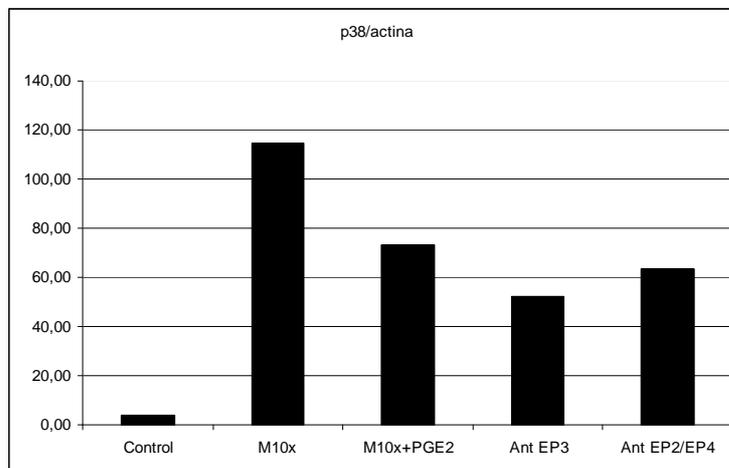
A.



B.



C.



D.

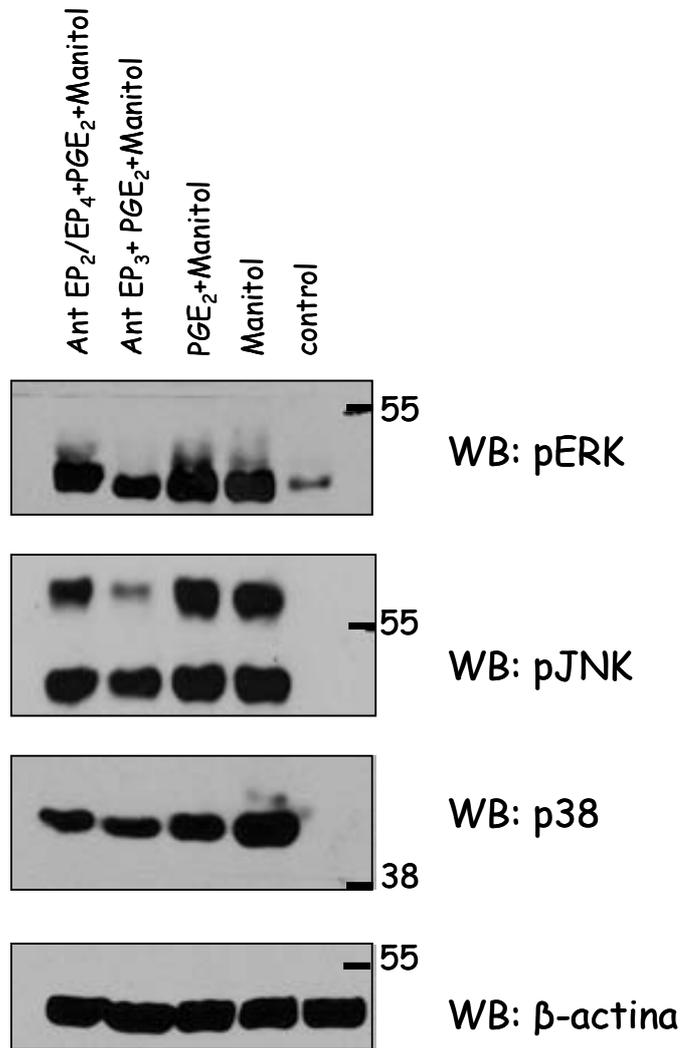


Fig. 38 El tratamiento con PGE₂ y con el antagonista de EP₃ disminuye la fosforilación de pERK, pJNK y p38. A 0.5×10^6 células HMC-1 por punto, luego de los tratamientos y la activación con Manitol, se lisan y se corre el gel SDS-PAGE al 10%, se transfiere a una membrana de PVDF que se incuba con el anticuerpo anti-pERK, pJNK, p38 y β-actina como control de carga.

C.8 Efecto de Prostaglandina E₂ en la dinámica del citoesqueleto en presencia del estímulo osmótico

Previamente en la sección A.6 se evalúa el efecto del estímulo osmótico en la dinámica del citoesqueleto, y se observa que hay un incremento en la movilización de la actina, mediante la técnica de microscopía con el marcaje de Faloidina, en este apartado se presenta lo que sucede al pretratar las células LAD2 con PGE₂ 1 μ M diez minutos antes de adicionar el Manitol 10%, en las imágenes de la figura 39 se observa que la polimerización del citoesqueleto se ve reducida con respecto al grupo tratado solo con Manitol.

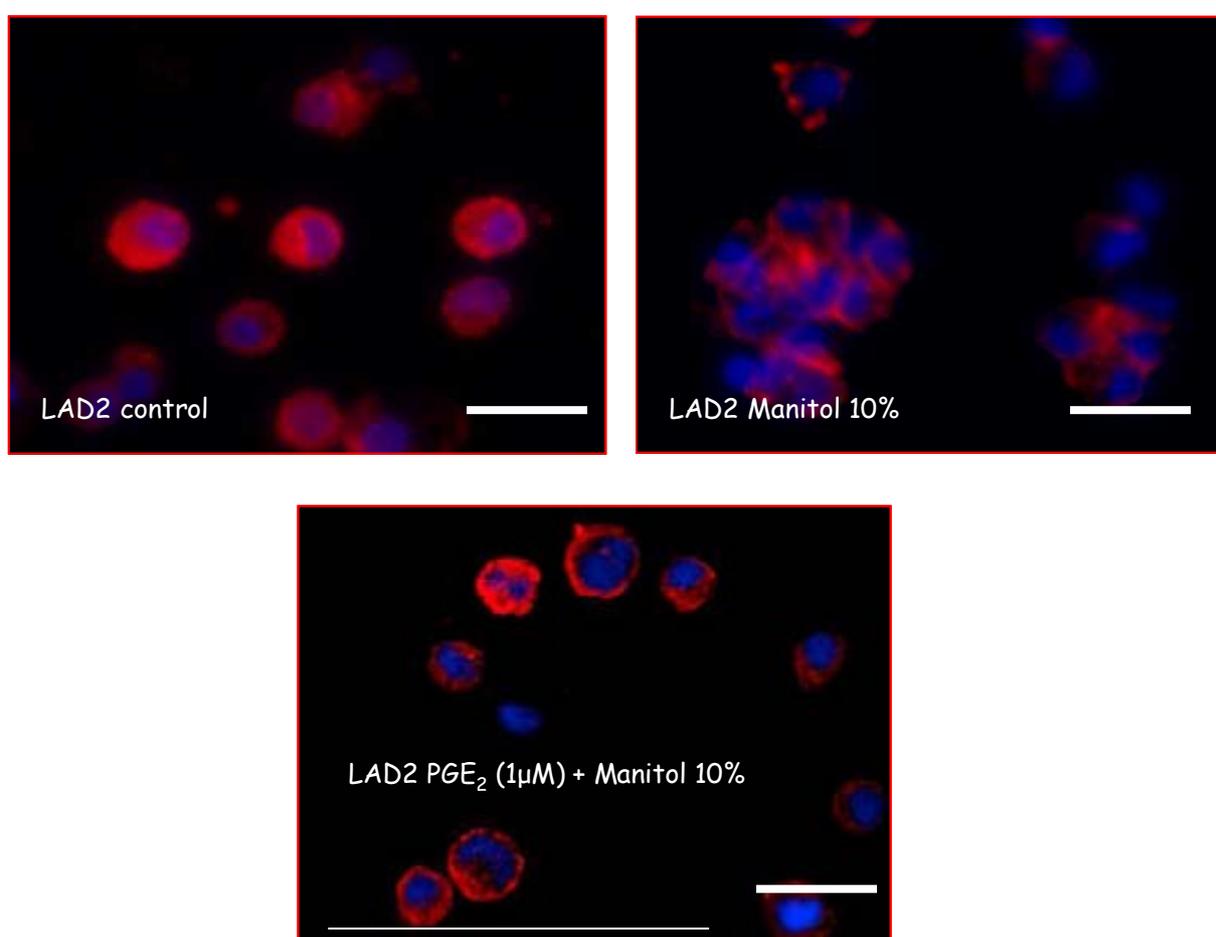


Fig. 39 Estudio de reorganización del citoesqueleto por microscopía comparando el efecto de PGE₂ frente al estímulo osmótico. 1x10⁵ células LAD2 se colocan en cubreobjetos previamente tratados con polilisina porque son células que crecen en suspensión, y se incuban con PGE₂ 1 μ M 10 minutos y luego con Manitol 10% por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar las células, se fijan con paraformaldehído al 4%, se fijan con saponina al 0.1%, se bloquean con BSA al 0.1% y se marcan con Faloidina conjugada con TRITC. Se realiza el montaje en los portaobjetos y las muestras son analizadas por microscopía de Fluorescencia. Escala de la barra 10 μ m.

C. 9 Evaluación del efecto de la Prostaglandina E₂ en la síntesis de citocinas

Después de observar que el estímulo osmótico es capaz de inducir síntesis de citocinas, como la IL-8 y el TNF- α , se evalúa la expresión de ARN mensajero en las células LAD2 después de 6 horas de incubación con los PGE₂, PGE₂ más Manitol y se comparan con el Manitol 10% y como control positivo de activación se tiene la PMA+Ionomicina, todo mediante la técnica de RT-PCR, se representan los datos en la figura 40 mediante la cuantificación relativa (RQ) de la expresión de los genes en estudio.

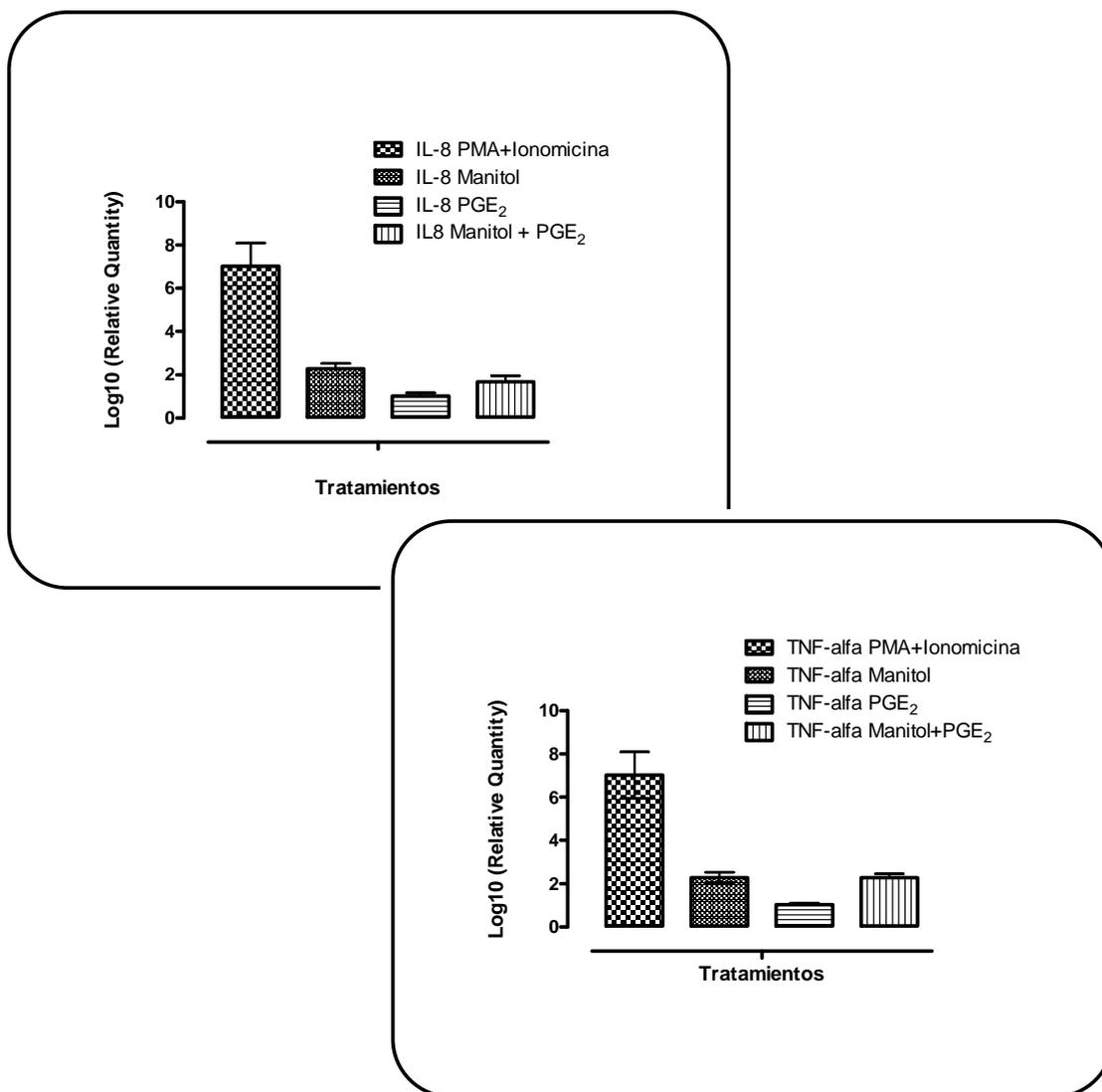


Fig. 40 Determinación de la síntesis de citocinas (TNF-alfa/IL-8) inducidas por el estímulo osmótico por RT-PCR. 2×10^6 células LAD2 por cada punto de activación se incuban durante 6 horas con Manitol al 10%, PMA (50ng/ml) más ionomicina (2.5 μ M), PGE₂ 1 μ M, PGE₂ 1 μ M más Manitol y un grupo sin activar. Transcurrido este tiempo se recogen las células y se extrae el ARN, y la expresión de los genes se mide por PCR a tiempo real, con respecto al control no activado, la beta-actina se utiliza como control endógeno; se representa una media de 3 experimentos independientes, los datos son presentados como el promedio del Log10 de la cantidad relativa (RQ).

En las gráficas se observa que la PGE₂ induce síntesis de IL-8 y TNF-alfa, pero menos que el manitol, y cuando se utilizan en combinación no hay diferencias con respecto al estímulo osmótico solo, en todos los casos estas inducción son menores que el control positivo de PMA+Ionomicina.

DISCUSSION

V. DISCUSION

El asma es una enfermedad crónica común de las vías respiratorias compleja y multifactorial. La inflamación desempeña un papel central en la fisiopatología del asma, aunque hay distintos fenotipos (por ejemplo, intermitente, persistente, asociada con el ejercicio, sensible a la aspirina, o el asma grave), la inflamación de las vías aéreas sigue siendo un patrón consistente; que implica la interacción de múltiples mediadores y muchos tipos de células, entre estos el mastocito (Busse & Lemanske, 2001).

La broncoconstricción inducida por ejercicio (BIE) es una condición prevalente en aproximadamente la mitad de los pacientes con asma (Cabral et al, 1999). El ejercicio induce la liberación de mediadores a partir del mastocito, provocando contracción del músculo liso de las vías aéreas, mediante el incremento de la tonicidad. El uso de un agente hipertónico surge del concepto de que la BIE viene provocada por el incremento en la osmolaridad en la superficie de las vías aéreas con liberación de mediadores (Anderson, 2010).

La activación de los mastocitos de la mucosa libera mediadores broncoconstrictores; como histamina, cys-LTs, PGD₂ (Boyce, 2003; Galli et al 2005; Robinson 2004) y se ha observado aumento del número de mastocitos en el músculo liso bronquial que puede estar relacionado con hiperreactividad bronquial (Brightling et al, 2002). Por otra parte, también hay liberación de PGE₂, que aunque es proinflamatorio en modelos de artritis (Nagai, 2008), es marcadamente anti-alérgica y parece tener efectos estabilizantes *in vivo*, representando un posible mecanismo endógeno protector de las vías aéreas (Gauvreau et al, 1999). En pacientes asmáticos, la administración de PGE₂ antes de la exposición al alérgeno, atenúa la respuesta alérgica inducida en las vías aéreas, así como la hiperreactividad y la inflamación (Melillo et al, 1994).

Se ha reportado que los niveles de PGE₂ están disminuidos en pacientes con pólipos nasales (Okano et al 2009), debido a alteraciones en el metabolismo de las COX (Mullol et al, 2002; Pérez-Novo et al, 2005; Picado et al, 1999), y esto puede participar en la fisiopatología de la rinitis alérgica, dirigiendo las bases de nuevas aproximaciones terapéuticas en las que la diana sería PGE₂ para el tratamiento de poliposis nasales, rinitis alérgicas y asma bronquial (Okano et al, 2009).

1. El estímulo osmótico es capaz de inducir la activación del mastocito

El interés de esta tesis se centra en un modelo *in vitro* de asma inducida por ejercicio mediante el uso de un estímulo osmótico, en este caso el manitol, en una de las células con mayor protagonismo en la enfermedades alérgicas, el mastocito; y evaluar si la PGE₂, sustancia endógena con un papel en la homeostasis de muchas funciones fisiológicas, es capaz de modular la activación de éste.

Eventos que produce el Manitol en el mastocito

El mecanismo por el cual el manitol activa el mastocito no está del todo descrito y difiere de la activación inmunológica (Suzuki et al, 2006). Los resultados obtenidos muestran que es un proceso parcialmente dependiente de calcio, tanto del extracelular como el intracelular, y es un evento sostenido. Este flujo de calcio genera cambios en la permeabilidad de la célula y esto a su vez del pH intracelular, el cual es regulado por intercambiadores de iones, como el de Na⁺/H⁺ en la membrana plasmática (Cabado et al, 2000). A su vez la movilización de calcio generada por la activación con manitol, produce una complicada serie de eventos bioquímicos, algunos tienen similitud al descrito para la mediada por FcεRI, con incremento de calcio citoplasmático en el que se activa la PI3K (Gilfillan & Tkaczyk, 2006). El estímulo osmótico al generar entrada de calcio a la célula y alterar la membrana activa la PLA₂ (Murakami & Kudo, 2004), la cual hidroliza los fosfolípidos de membrana con liberación de AA. Por otro lado, el sustrato de fosfoinositoles de la membrana también es metabolizado por la PLC con la formación de DAG y de IP₃ que en el retículo endoplásmico libera más calcio de sus depósitos (Goodman & Gilman, 2006); estas vías de señalización producen un flujo de calcio sostenido, tal como muestran los resultados en los ensayos de flujo de calcio por fluorimetría. El incremento del calcio intracelular también provoca movilización de los gránulos de almacenamiento hacia la membrana del mastocito y liberar por exocitosis su contenido al espacio extracelular; tal como lo demuestran los datos de liberación por β-hexosaminidasa y la expresión de la proteína CD63. Todos los mecanismos por el cual el manitol activa el mastocito se resumen en la figura 1, el proceso de desgranulación se observa a los minutos de la activación, pero el manitol también induce cambios a más largo tiempo.

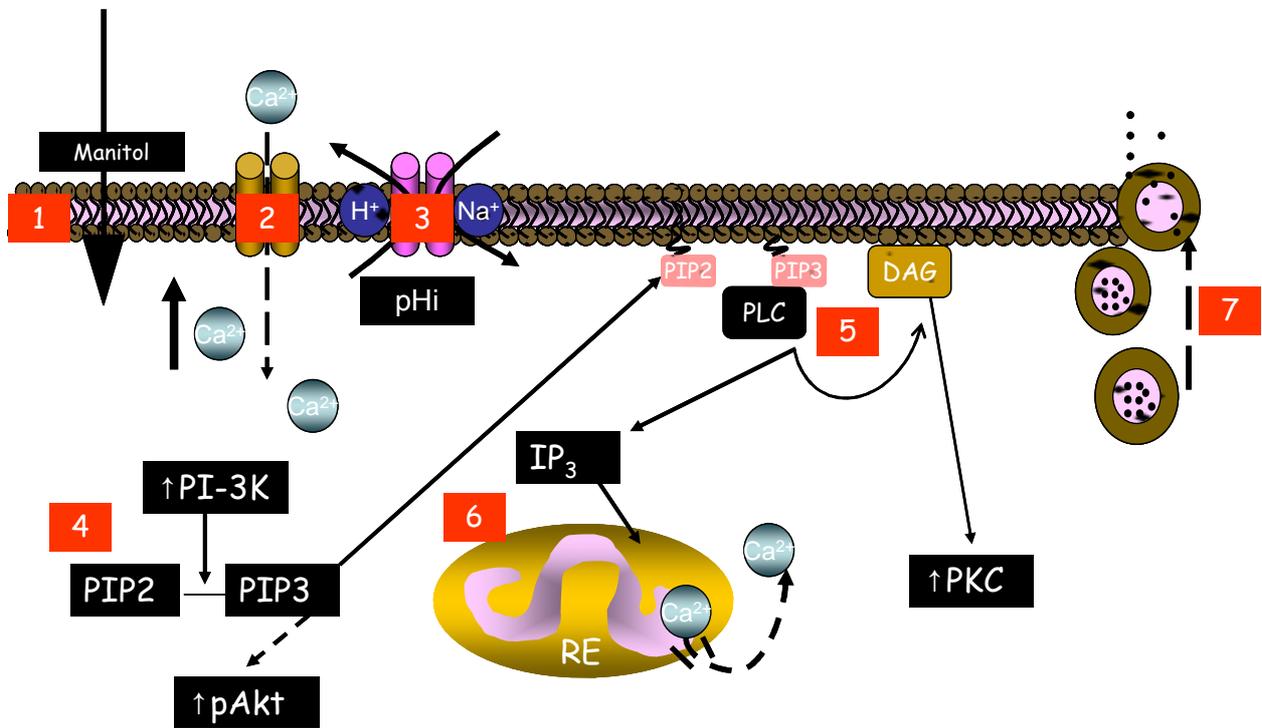


Fig. 1 Esquema de los posibles mecanismos por el que el manitol induce la activación del mastocito. (1) Aumento de la osmolaridad, (2) Aumento del flujo de calcio, (3) Activación del intercambiador Na⁺/H⁺ con cambios en del pH intracelular, (4) Activación de la vía PI3K y Akt genera fosfoinosítoles, (5) Activación de PLC gracias a sus dominios PH se une a los PIP3 generados por PI3K y cataliza PIP2 (unidos a la membrana) en DAG e IP₃, activación de PKC, (6) IP₃ induce salida de calcio de retículo endoplásmico (RE) con aumento de calcio de manera más sostenida (7) Excitocitosis de los gránulos.

El estímulo osmótico induce la síntesis de novo de metabolitos del AA tales como PGD₂ y LTC₄ (Gulliksson et al, 2006), y lo evidencian nuestros resultados con la síntesis de PGE₂ a los pocos minutos de la activación del mastocito. En el caso de la fosforilación de Akt, regula la función del factor de transcripción NF-κβ, este mecanismo junto con los efectos que tiene la PI3K sobre la habilidad de la PLCγ en la regulación de la activación del factor de transcripción NFAT (Jascur et al, 1997), permiten a la PI3K regular la síntesis de citocinas (Gilfillan and Tkaczyk, 2006) como el TNF-α y quimiocinas como la IL-8. El TNF-α estimula la inflamación y la producción de citocinas (IL-6, IL-1) por muchos tipos celulares y activa el endotelio mediante activación y agregación plaquetaria, aumento de la permeabilidad vascular; además fue descrito como factor tóxico para algunas células en cultivo, y causante de necrosis hemorrágica de tumores in vivo, es el principal mediador de la respuesta inmune frente a bacterias Gram negativas (Vassalli, 1992). En cuanto a la IL-8, esta quimiocina ejerce un papel primordial en la iniciación de la respuesta inflamatoria al promover la

quimiotaxis y posterior desgranulación de los neutrófilos. Además, desarrolla una acción quimiotáctica sobre otras células entre las que se encuentran los linfocitos T y los basófilos. Sobre estos últimos estimula la liberación de histamina. Algunas de las acciones proinflamatorias del TNF- α y la IL-1 son mediadas por la secreción de IL-8, que por tanto actúa como un mediador secundario de los procesos inflamatorios (Salamon et al, 2005). Todos estos eventos explicarían porque la activación del mastocito inducida por cambios osmóticos, produce cambios inflamatorios tales como los observados vía inmunológica. Las citocinas provocarían la migración de células inflamatorias a las vías respiratorias, donde se produciría la broncoconstricción que genera el ejercicio. Los cambios osmóticos también modificaciones estructurales en el mastocito, como es la reorganización del citoesqueleto.

En los estudios de reorganización del citoesqueleto observamos que el mastocito estimulado con manitol cambia su estructura y se observa el fenómeno de *ruffling*, que son regiones de filamentos de actina recién polimerizados. El mecanismo de acción ha sido descrito en otros tipos celulares, es un proceso rápido en el que los cambios osmóticos activan la familia de GTPasas de Rho; y es dependiente de calcio (Malek et al, 2007). La familia de Rho GTPasas regulan la dinámica del metabolismo de actina y el proceso de *ruffling* en la membrana (Pertz, 2010).

Activación de las MAP quinasas

La producción de citocinas luego de la activación con manitol es el producto de la activación de vías de señalización previas como las MAP quinasas, tal como se observa en los resultados de los estudios bioquímicos, y como se reporta para otras células eucariotas, que tienen en común el hecho de que censan y responden a los estímulos extracelulares mediante la activación de la vía de las MAP quinasas (Wilkinson & Millar, 1998). Los resultados con el manitol muestran un aumento de la fosforilación de ERK1/2; además de quinasas de estrés como JNK y p38; como se ha reportado para condiciones hiperosmolares (Malek et al, 2007). La activación de quinasas como ERK1/2 produce la fosforilación de enzimas como la PLA₂ (Pelaia et al, 2005), la cual es responsable de la producción del AA que es metabolizado a su vez por las COX y LOX a prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. Es interesante el papel de la fosforilación de ERK en la patofisiología del asma, ya que median la producción de citocinas como la IL-1 β y del GM-CSF por las células del músculo liso de las vías aéreas (Hallsworth et al, 2001), que son las responsables de las respuestas contráctiles y del remodelado de las vías aéreas (Pelaia et al, 2005). El manitol fosforila las quinasas de estrés JNK y p38. La quinasa JNK esta muy relacionada a procesos de inflamación ya

que entre los factores de transcripción que son sustratos para él, están la proteína activadora 1 (AP-1), Elk-1 y ATF-2; el papel de JNK en la patología asmática esta vinculada a procesos de deposición de la matriz extracelular, ya que su activación produce la liberación de factores de crecimiento como el TGF- β que promueve la transición del fenotipo de fibroblastos pulmonar a miofibroblastos (Hashimoto et al, 2001). La p38 regula la migración de mastocitos hacia el antígeno y también media la producción de IL-8. Además, está involucrada en procesos de hiperplasia del miofibroblasto y deposición de colágeno inducida por IL-6, luego del contacto con otras células como el caso del mastocito (Fitzgerald et al, 2004) (Fig. 2).

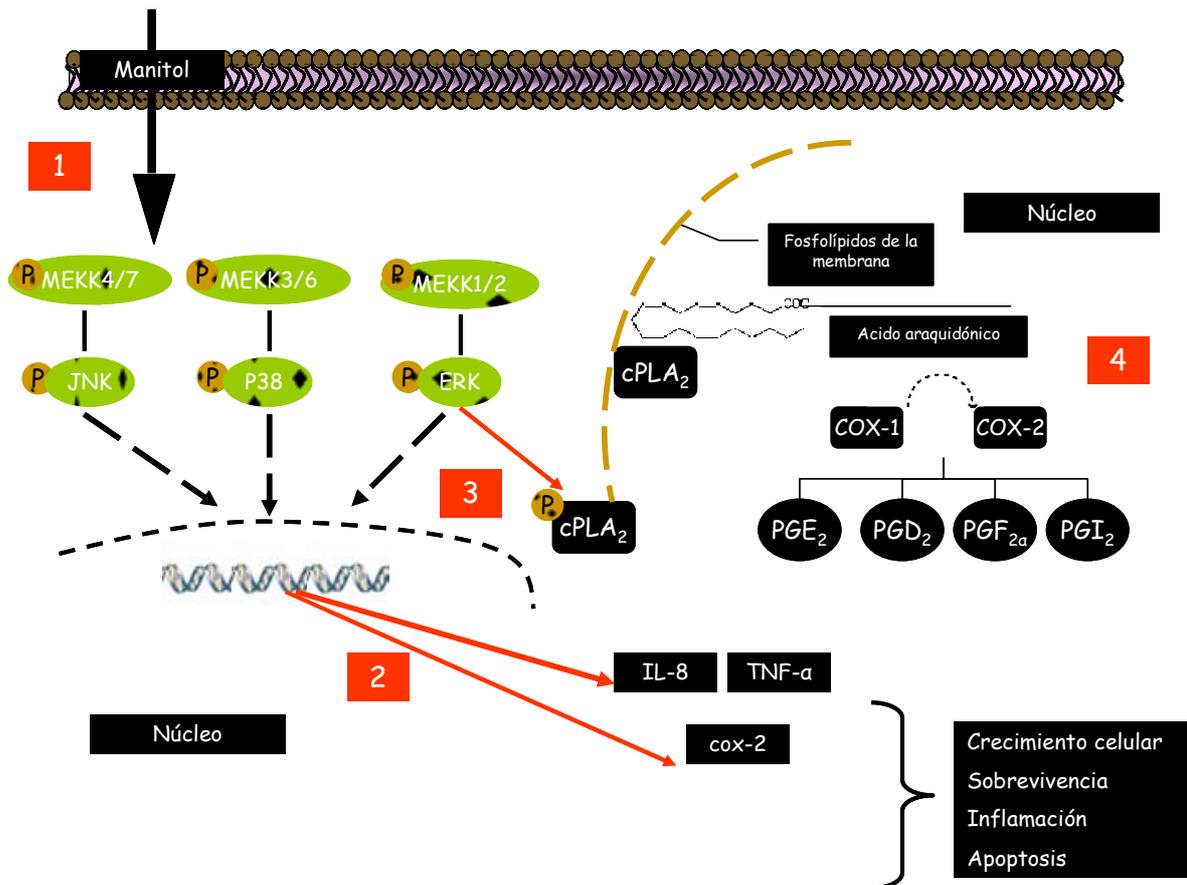


Fig. 2 Efectos del manitol dentro del mastocito (1) Activación de MAP quinasas (2) p38 fosforilada induce producción de COX-2, IL-8 y TNF- α (3) pERK1/2 fosforila PLA₂ en el citoplasma y la activa traslocándola, (4) la PLA₂ produce AA, sustrato para las COXs, con producción de PGs.

Al utilizar inhibidores wortmanina (inhibidor de PI3K) se observa que la fosforilación de Akt inducida por manitol está bloqueada, al igual que cuando se inhibe la de ERK pero en el caso de la PKC no se ve afectada.

2. Cómo se ve afectada la activación del mastocito por el estímulo osmótico cuando se inhiben las Ciclooxigenasas

Los metabolitos del AA que incluyen prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano A₂, leucotrienos y lipoxinas, no se almacenan, sino que se producen en la mayoría de las células cuando una variedad de estímulos físicos, químicos y hormonales activan enzimas como la PLA₂ que es una acil hidrolasa (Goodman & Gilman, 2006). En el caso del mastocito el estímulo físico utilizado, el manitol, produce desgranulación, pero también genera la síntesis de novo de metabolitos de AA, entre estos PGE₂ que es considerado una sustancia anti-inflamatoria. Además, la evidencia que tenemos en base a nuestros resultados y lo descrito en la literatura, es que el manitol activa la vía de las MAP quinasas, entre estas la p38 de la que se describe que participa en la producción de COX-2 (Pelaia et al, 2005). En vista de esto, se procedió a utilizar la inhibición de las COXs para modular la producción de PGE₂ y observar que sucedía en el mastocito, luego de estimular con manitol. El interés de realizar este abordaje *in vitro* se debe a las observaciones clínicas de pacientes asmáticos, que al ingerir un AINEs y luego ser expuestos a ejercicio, les sobreviene un broncoespasmo. Esto se atribuye a que al inhibir las COXs no se produce PGE₂ endógena, la cual tiene un papel broncoprotector, y el paciente desarrolla un cuadro asmático (Sestini et al, 1996).

Para inhibir la activación de COX-1 y COX-2, se utilizó la técnica de silenciamiento con RNA de interferencia, pero no era el modelo adecuado, en vista de que la línea LAD2 por un lado tiene una cinética de recambio prolongado. Conviene añadir que es una línea celular inmortal. Por lo que se optó la inhibición de las COXs se realizó con bloqueadores selectivos.

Al evaluar el proceso de desgranulación con manitol luego de la inhibición de las COXs no se observa cambios significativos en la liberación de β -hex, por lo que la desgranulación sería un evento independiente de la actividad de las COXs.

En la cascada de las MAP quinasas observamos que cuando se inhibe la COX-1 con el SC-560, luego del estímulo osmótico, hay un incremento en la fosforilación de ERK1/2 y Akt, la vía de JNK y p38. Para explicar este resultado, por un lado tenemos que al inhibirse una de las enzimas hay mayor cantidad de AA como sustrato para la vía que permanece activa, la COX-2. Así mismo, la línea LAD2 tiene COX-2 de manera "constitutiva" con lo cual existiría un efecto aditivo a la enzima que se está induciendo por cuenta del manitol. Otro hecho a destacar, es que la p38 produce más COX-2 y ERK1/2 fosforila la PLA₂ citoplasmática (Pelaia et al, 2005). Este hallazgo curioso, se

podría explicar como una especie de retroalimentación positiva de la actividad de COX-2. En consecuencia hay mayor generación de metabolitos del AA, y posiblemente habría un aumento en la síntesis de citocinas.

En cambio cuando se bloquea con el inhibidor de COX-2, NS-398, el manitol incrementa sólo la fosforilación de ERK1/2, la pJNK no muestra cambios en el patrón de fosforilación, pero p38 disminuye de manera importante al igual que Akt; esto sugeriría que la enzima que tiene el papel primordial en los procesos inflamatorios vía AA es la COX-2 (Fig. 3).

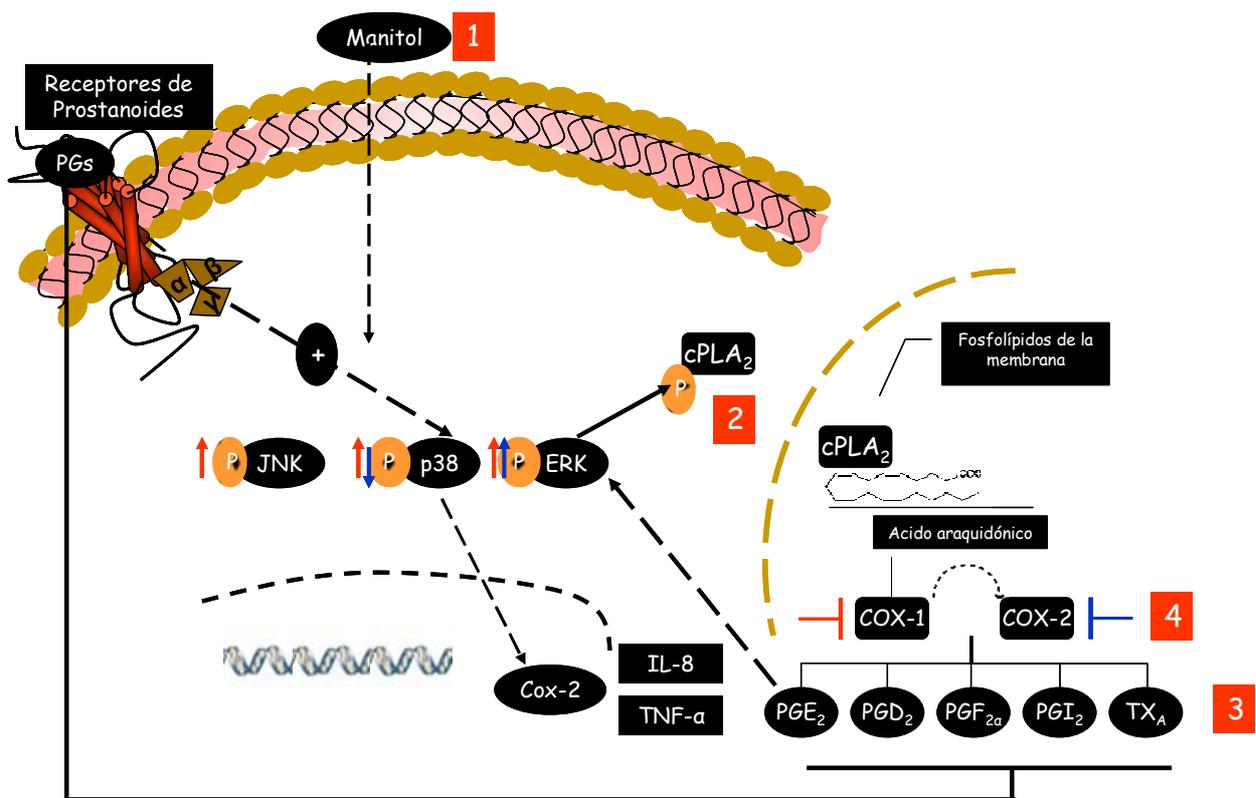


Fig. 3 Inhibidores de COXs en la activación osmótica Modelo en el que la vía de las COXs están bloqueadas (1) el estímulo osmótico activa MAP quinasas (2) ERK fosforila PLA₂ que produce AA y sus metabolitos, p38 produce más COX-2 (3) los prostanooides sintetizados de novo son secretados y se unen a receptores proteína G de membrana que a su vez activa MAP quinasas, (4) Bloqueo de COX-1 (rojo) aumenta fosforilación de MAP quinasas (4) Bloqueo de COX-2 (azul) produce fosforilación de ERK.

Se realizó también la inhibición de ambas enzimas con el ácido acetilsalicílico (ASA), pero no se observa ningún patrón de fosforilación en las MAP quinasas estudiadas; este resultado se explicaría que la activación de MAP quinasas depende de la actividad de COX-1 y COX-2, probablemente vía síntesis de prostaglandinas tales como la PGD₂ y

PGE₂. La inhibición de las COXs, al menos en nuestro trabajo no reporto cambios significativos en los valores de desgranulación.

3. Prostaglandina E₂, expresión de receptores en el mastocito, modulación del estímulo osmótico y otros aspectos asociados a la transducción de señal.

Para evaluar el efecto de PGE₂, tanto de la que se administra de manera exógena como la que se sintetiza de novo producto de la estimulación osmótica del mastocito, utilizamos como herramienta antagonistas farmacológicos de los receptores de prostanoideos, referidos en el apartado de introducción; esto nos permitió describir el efecto de PGE₂ de manera selectiva en cada receptor expresado por el mastocito; con excepción del receptor EP₁, que no se expresa en las LAD2, ni en los mastocitos provenientes de progenitores, tal como muestran los estudios de expresión de receptores por PCR y WB. Otro hecho importante es que la población de receptores EP₃ está expresado en mayor número, seguido por EP₄ y por último EP₂.

Luego de incubar con los tratamientos y dosis crecientes de PGE₂ tal como se describe en el apartado de resultados para LAD2, observamos que el efecto de activar el receptor EP₂ es de disminución en el porcentaje de liberación de β-hex, esto se debe a que al mecanismo de señalización de este receptor es a través de proteína Gs que genera aumento de AMPc; lo que en el mastocito produce disminución de la concentración del calcio intracelular y como consecuencia menor movilización de los gránulos hacia la membrana celular; este mecanismo lo comparte con el receptor EP₄, sin embargo entre estos dos receptores existen diferencias estructurales que limitan la actividad de uno frente al otro. El receptor EP₂ no presenta problemas de desensibilización al poseer una cola citoplasmática corta con pocos sitios para fosforilación, y por otra parte experimenta regulación positiva en caso de procesos inflamatorios (Goodman & Gilman, 2006) con aumento en la expresión de este receptor en la membrana celular. En cambio, el receptor EP₄ es susceptible a desensibilización ya que tiene una cola citoplasmática extensa con diferentes sitios de fosforilación (Nishigaki et al, 1996), y el receptor es endocitado disminuyendo su expresión.

En el caso del receptor EP₃, con excepción de la dosis más alta de PGE₂ (10μM) y del manitol junto con los antagonistas que producen aumento en las medidas de β-hex, las demás dosis de PGE₂ producen disminución. La particularidad de este receptor tal como se describe en la introducción es el polimorfismo en que encontramos diversas isoformas, aunque en esta tesis no distinguimos que isoformas expresan los mastocitos

utilizados, es evidente que el efecto en los ensayos de desgranulación no son homogéneos. Se ha reportado que la PGE₂ a dosis más elevadas aumenta la liberación de mediadores (Wang & Lau, 2006) ya que potencia la liberación de histamina cuando el mastocito es activado por la vía inmunológica por interactuar con el receptor EP₃. El mecanismo de señalización del EP₃ es vía proteína Gi con disminución de AMPc, y aumento de calcio intracelular. La presencia de varias isoformas podría explicar porque en modelos *in vivo* como el de ratón se han observado efectos protectores en proceso mediados por la vía inmunológica, suprimiendo la inflamación alérgica (Kunikata et al, 2005).

En el caso de mastocitos diferenciados a partir de progenitores, utilizamos PGE₂ a 1μM, hay mayor liberación de mediadores cuando administra en junto con manitol, pero al evaluar cada receptor, el efecto que produce en todos los casos es disminución de la liberación de β-hex, aunque más significativa para los receptores EP₂ y EP₄. En cambio en los mastocitos obtenidos de pulmón la PGE₂ produce disminución de la liberación en todos los casos, pero cuando se une al receptor EP₃ no disminuye el aumento debido al estímulo osmótico. Este último dato es importante ya que el modelo protector de la PGE₂ frente a un estímulo osmótico queda demostrado en el fenotipo de mastocito de las vías aéreas, como es el obtenido del pulmón.

En estudios realizados en mastocitos diferenciados a partir de progenitores por Feng y colaboradores, observaron que la expresión de receptores es similar a las vista en esta tesis, PGE₂ aumenta la movilización de calcio y AMPc, igualmente encontraron aumento de la fosforilación de ERK y la síntesis de PGD₂ y LTC₄, con el uso de agonistas selectivos observaron que el receptor EP₃ es el responsable de los efectos activadores de PGE₂.

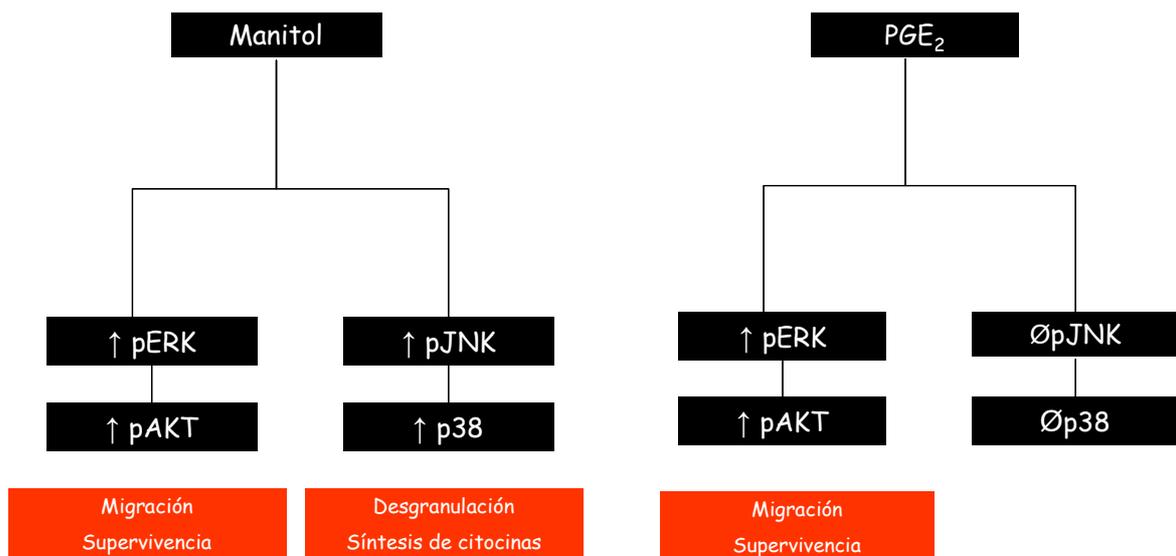
En los estudios realizados en la movilización de calcio en las LAD2 la administración previa de PGE₂, o adicionada luego de bloquear el receptor EP₃, es disminución del flujo de calcio. Estos datos corroboran lo observado en los ensayos de desgranulación, que muestran el papel protector de esta prostaglandina ante el Manitol, respuestas mediadas principalmente por los receptores EP₂/EP₄ que incrementan las concentraciones de AMPc que a su vez reducirían el calcio intracelular (Nishigaki et al, 1996).

En los estudios de reorganización del citoesqueleto evaluado en las LAD2, la administración de PGE₂ antes del manitol, evidencia la poca formación de polímeros de actina en la célula. Esto se podría relacionar con la movilización de calcio que se ve disminuida con el uso de PGE₂. Este proceso ha sido evaluado en fibroblastos de las

vía aéreas en los que se ha visto que la PGE₂ disminuye la migración celular por interrupción de la reorganización del citoesqueleto y el mecanismo de acción que postulan es que al interactuar la PGE₂ con los receptores EP₂/EP₄ aumenta las concentraciones de AMPc con disminución del calcio intracelular (Sandulache et al, 2009). Los filamentos de actina tienen un papel fundamental en la determinación y el mantenimiento de la morfología celular, en el movimiento e interacción con el ambiente exterior y en la división/proliferación celular.

La activación de las MAP quinasas fue evaluado tanto en LAD2 como en HMC-1, otra línea celular de mastocitos humanos. En LAD2 la administración exógena de PGE₂ incrementa la fosforilación de ERK1/2 y Akt, en cambio las quinasas JNK y p38 no. La consecuencia de esto sería la producción de citocinas que tienen implicaciones en procesos de supervivencia y migración celular, a través de ERK y Akt (Fig.4).

Al bloquear el receptor EP₃, la PGE₂ exógena reduce la fosforilación que genera el manitol en ERK1/2, Akt, JNK, p38; otra evidencia de que los efectos protectores de esta prostaglandina son mediados por los receptores EP₂/EP₄. En las HMC-1 la fosforilación de ERK, JNK y p38 también disminuyen cuando la PGE₂ interacciona con los receptores EP₂/EP₄, ante la activación osmótica. La p38 es una de las MAP quinasa donde convergen la iniciación y progresión de procesos inflamatorios e inmunopatológicos, y se considera diana clave en el desarrollo de fármacos antiasmáticos (Newton & Holden, 2003).



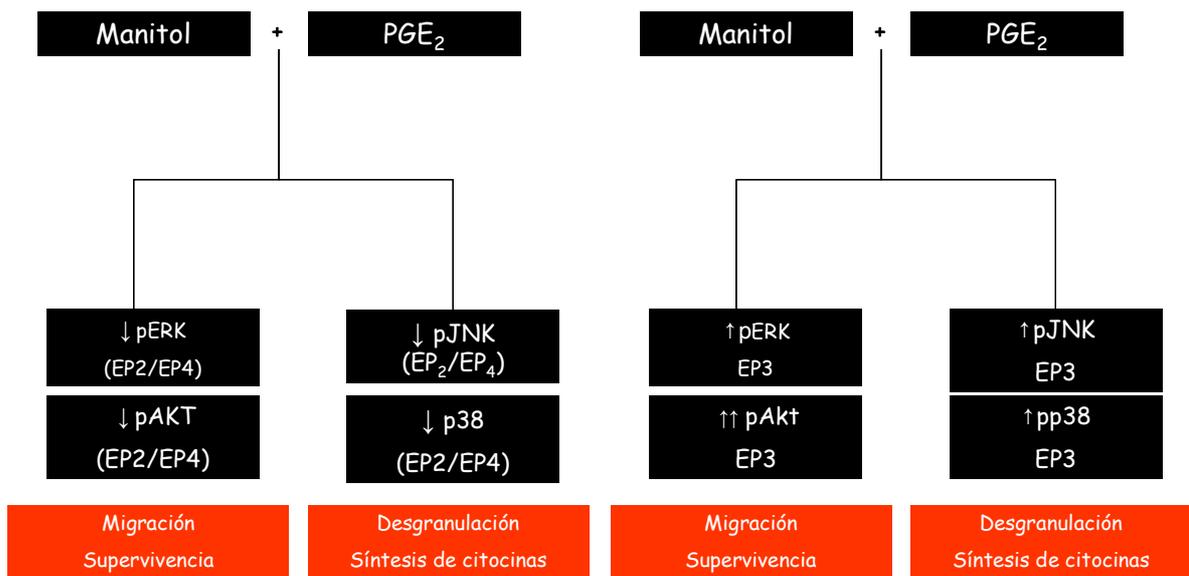


Fig. 4 Resumen del efecto de PGE₂ y Manitol en las vías de las MAP quinasas y PI3K

Resumen de los efectos en las vías de las MAP quinasas en la administración de PGE₂ en los receptores de prostanoideos. En paréntesis los receptores implicados en el efecto activador o inhibitor de MAP quinasas.

En resumen las MAP quinasas están implicadas en una serie de eventos de señalización que son potencialmente importantes en la respuesta inflamatoria. ERK1/2 fosforila y activa los factores de transcripción elk1 y NF-IL6 (Gillie et al, 1992; Nakajima et al, 1993). Elk1 es requerido para la regulación hacia positiva de c-fos, el cual es un componente del factor de transcripción AP-1 que tiene un papel importante en la regulación de citocinas y metaloproteasas, (Karin, 1995) y el NF-IL6 promueve la regulación de granulocitos (G)-CSF, IL-6, IL-8, IL-1, TNF, y la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Natsuka et al, 1992; Zhang et al 1993, Mukaida et al, 1990; Lowenstein et al, 1993). Las ERKs también fosforilan la PLA₂ citoplasmática (cPLA₂), la cual está implicada en la producción de AA (Lin et al, 1993).

La PGE₂ tiene un perfil de acción similar cuando la activación del mastocito es inmunológica, ya que hay estudios que reporta la inhibición de la exocitosis y la liberación de eicosanoides dependiente del Fcε-RI (Goulet et al, 2004) y en otros estudios cómo potencia la liberación de histamina y producción de IL-6 a través del receptor EP₃ (Nguyen et al, 2002; Díaz et al, 2002).

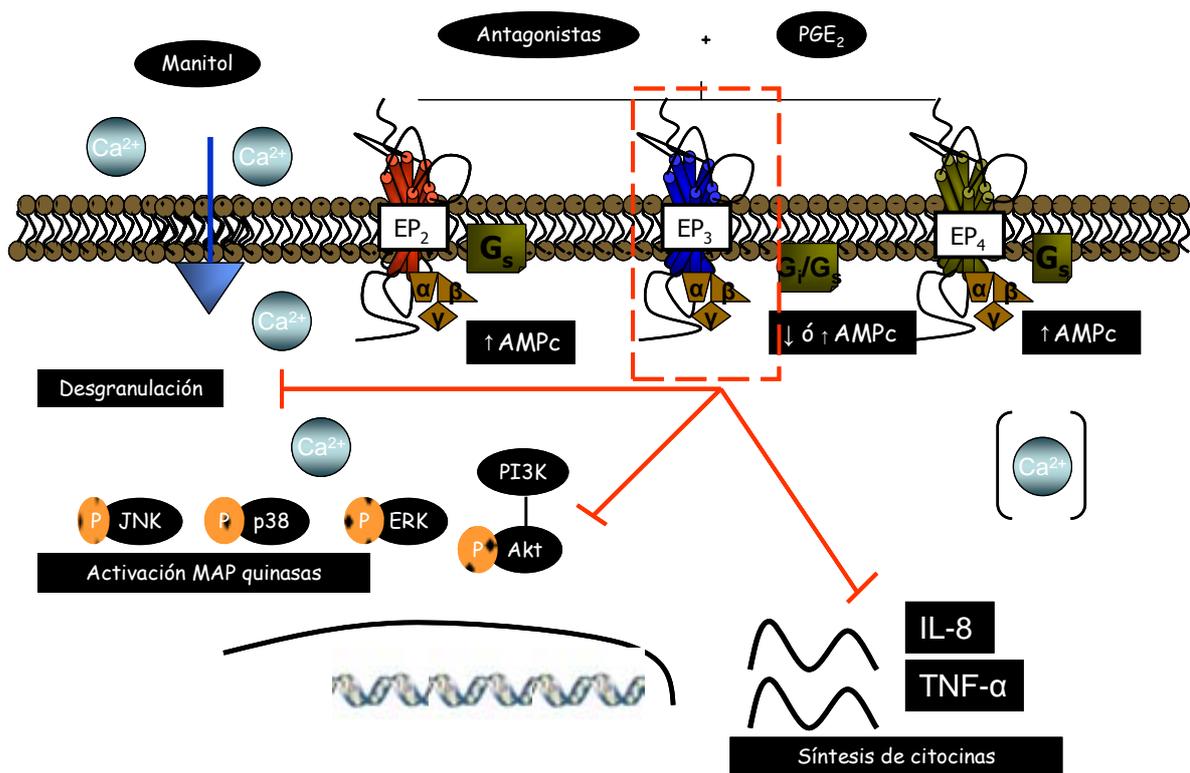


Fig. 5 Resumen de los efectos mediados por PGE₂ en la activación osmótica inducida por manitol a través de los receptores EP. Al antagonizar el receptor EP₃ los efectos en desgranulación, activación de MAP quinasas, síntesis de citocinas están disminuidos. Por lo que los receptores EP₂/EP₄ en este modelo de activación osmótica *in vitro*, manifiestan un papel protector.

4. ¿Qué se sabe del papel de PGE₂ en modelos animales?

La PGE₂ ha demostrado efectos broncoprotectores en pacientes con asma bronquial, en el asma inducida por ejercicio, inducida por alérgenos y en la broncoconstricción inducida por aspirina (Melillo et al, 1992; Pavord et al, 1993). Por lo que la PGE₂ puede representar un mecanismo protector endógeno de las vías aéreas. En estudios *in vitro* nuestros resultados como los de Feng y colaboradores describen la activación del mastocito, vía receptor EP₃ cuando se administra PGE₂, y que junto con la estimulación inmunológica se producen una serie de cambios bioquímicos como la producción de citocinas y de eicosanoides (Feng et al, 2006). Pero al revisar los resultados experimentales en ratones las respuestas de la PGE₂, son controversiales. La PGE₂ claramente es broncoprotectora, pero depende del receptor involucrado. En unos estudios en ratones manipulados genéticamente la respuesta a través del receptor EP₂ parece mediar el efecto broncodilatador como en la prueba de inhalación con el agonistas colinérgicos, metacolina (Sheller et al, 2000). También en el modelo

de ratones expuesto a ácaros del polvo, la vía COX-2/PGE₂/EP₂ esta regulada de manera positiva en el pulmón, posiblemente para disminuir la inflamación de las vías aéreas inducidas por esta sensibilización (Herrerias et al, 2009). En cambio en un modelo de sensibilización por OVA-albúmina en ratones con deficiencia del receptor EP₃ observaron que este ratón desarrollaba un cuadro de inflamación alérgica que mejoraba cuando se administraba agonistas del EP₃ y en ratones normales se les rescataba con la adición del agonista de EP₃ (Kunikata et al, 2005) y en los estudios que emplean ratones deficientes de genes para receptores de prostaglandinas y de TxA₂ concluyen que con sus datos, los agonistas de EP₃ y antagonistas del receptor DP de la PGD₂ podrían ser útiles aliviando la inflamación alérgica de las vías aéreas (Nagai, 2008). Como se describe, la PGE₂ es una sustancia que manifiesta diferentes efectos que dependen del receptor que se active, además de las particularidades descritas para cada receptor en el que por una parte los problemas de desensibilización y de las diferentes isoformas descritos, determinan el efecto predominante de esta prostaglandina.

5. Posibilidades en Terapia

La PGE₂ es un eicosanoides ubicuo que está involucrado en diferentes procesos fisiológicos y patofisiológicos. Tiene complejas propiedades inmunológicas *in vitro*, cuando se administra por vía inhalatoria, en sujetos alérgicos antes de una prueba de provocación alérgica, inhibe tanto la fase temprana como tardía de la reacción alérgica (Gauvreau et al, 1999). En sujetos sensibilizado la PGE₂ es capaz de reducir la liberación de PGD₂ y cys-LTs en el fluido de lavado broncoalveolar, efectos que se observan en minutos, y se presume que sea resultado de su acción en los mastocitos (Harter et al, 2000). Estos efectos y otros que se han descrito en lo resultados obtenidos en nuestra tesis, son interesantes para considerar a la PGE₂ como un agente terapéutico en asma. Para ello convendría la generación de agonistas más selectivos, junto a la mejor caracterización de la función de las diferentes isoformas del receptor EP₃.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El manitol produce en el mastocito la liberación de mediadores, expresión del CD63, movimientos en el flujo de calcio extracelular e intracelular
2. El manitol generan cambios en la morfología de la célula que se traducen en la reorganización del citoesqueleto
3. El manitol activa MAP quinasas (ERK1/2, JNK y p38) y la de PI3 quinasa que resulta en la síntesis de citocinas, entre estas TNF-alfa y la IL-8,
4. La inhibición de las ciclooxigenasas, al menos en el modelo de activación osmótico, no afecta el proceso de desgranulación
5. En la activación de las MAP quinasas la inhibición de COX-1 aumenta la fosforilación de ERK1/2, JNK y p38, y de la pAkt, al compararla con el manitol
6. Cuando se inhibe la COX-2 la fosforilación de pJNK y pAkt está disminuida, la de p38 no muestra cambios, pero pERK está aumentada con respecto al manitol
7. En línea celular de mastocitos LAD2 expresa los receptores EP₂, EP₃ y EP₄ de la PGE₂ y en cultivos primarios de mastocitos provenientes de sangre periférica también se observaron la expresión de estos mismos receptores, no se tienen evidencia de receptores EP₁
8. La PGE₂ por su parte modula el efecto de manitol en el mastocito mediante reducción en la desgranulación que depende de la dosis, ya que con el uso de antagonistas revela que los receptores EP₂ y EP₄ son los implicados en el efecto neto de disminución de la desgranulación, disminución de la movilización de calcio disminución de la fosforilación de JNK y p38
9. PGE₂ modula los cambios en la dinámica del citoesqueleto, cuando se administra antes del manitol, confiriéndole estabilidad a la estructura
10. De manera global el efecto neto de PGE₂ es de protección, a través de los receptores EP₂/EP₄, frente a la agresión del manitol, en una célula tan compleja como el mastocito, que además es la que más protagonismo tiene en los procesos inflamatorios entre estos el asma.

BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A; Lichtman, A; Pillai, S. (2007) Cellular and molecular immunology. Saunder Elsevier. International Edition, 6th.
2. Abraham SN and St. John AL. (2010) Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews Immunology* 10, 440-452.
3. Anderson CK, Mori M, Bjermer L, Löfdahl C.G, Erjefalt JS (2009) Novel site-specific mast cell subpopulations in the human lung. *Thorax* 64:297-305
4. Anderson S., and Daviskas E. (2000) The mechanism of exercise-induced asthma is... *J Allergy Clin Immunol* 106: 453-9.
5. Anderson SD (2010) Indirect Challenge Tests: Airway. Hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance. *Chest* 138:25S-30S
6. Anderson SD. (1985) Issues in exercise-induced asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 76(6):763-72.
7. Barnes, PJ & Arcock, IM. (2003) How do corticosteroids work in asthma? *Annals of internal medicine* 139: 359-370.
8. Bastien L, Sawyer N, Grygorczyk R, Metter K, Adam M (1994) Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E2 receptor EP2 subtype. *The Journal of biological chemistry* 269:11873-77.
9. Belton O and Fitzgerald DJ (2003) The three major pathways involved in arachidonic acid metabolism. *Expert Reviews in Molecular Medicine* Vol. 5 <http://www.expertreviews.org/>
10. Bischoff SC. (2007) Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature Reviews* 7: 93-104.
11. Bos C., Richel D., Ritsema T., Peppelenbosch M., Versteeg H. (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1187-1205.
12. Boyce JA (2003) Mast cells: beyond IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111(1): 24–32.
13. Boyce JA (2007) Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunological Reviews* 217: 168–185
14. Bradding P, Okayama Y, Howarth PH and Church MK (1995) Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *Journal of Immunology* 155:297-307
15. Bradding P. & Wulff H. (2009b) The K channels $K_{Ca}3.1$ y $K_v1.3$ as novel targets for asthma therapy. *British Journal of Pharmacology* 157, 1330-1339.

16. Bradding P. (2003) The role of the mast cell in asthma: a reassessment. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 3:45-50.
17. Bradding P. (2009a) Human lung mast cell heterogeneity. *Thorax* 64 (4), 278-280
18. Bradding P., Brightling CE. (2007) Mast cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *Respiratory Medicine* 101, 1045.
19. Bradding P., Roberts JA., Britten KM., Montefort S., Djukanovic R., Mueller R. et al. (1994) Interleukin-4,-5 and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 10, 471-480.
20. Bradding P., Walls A., Holgate ST. (2006) The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 1277-84.
21. Brenneis C, Maier TJ, Schmidt R, Hofacker A, Zulauf L, Jakobsson PR, Scholich K, Geisslinger G (2006) Inhibition of prostaglandin E₂ synthesis by SC-560 is independent of cyclooxygenase 1 inhibition. *FASEB Journal* 20:1352-1360.
22. Breyer R., Bagdassarian C., Myers S. and Breyer M. (2001) Prostanoid Receptors: Subtypes and Signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 661-90.
23. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID (2002) Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *The New England Journal of Medicine*, 346:1699-1705.
24. Brightling CE., Ammit AJ., Kaur D., Black JL, Wardlaw AJ., Hughes JM et al.(2005) The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171, 1103-1108.
25. Brown JM, Wilson TM, Metcalfe DD. (2007) The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clinical and Experimental Allergy* 38:4-18.
26. Busse W, Elias J, Sheppard D, Banks-Schlegel S. (1999) Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1035-1042.
27. Busse W. and Lemanske R. (2001) Asthma. *The New England Journal of Medicine* 344(5), 350-362.

28. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ (1988) Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia research* 12(4):345-55.
29. Cabado A.G, Alfonso A., Vieytes M.R., Botana L.M. (2000) Hypertonicity-induced intracellular pH changes in rat mast cells. *Life Sciences* 67, 1969-1982.
30. Cabral AL, Conceicao GM, Fonseca-Guedes CH, Martins MA (1999) Exercise induced bronchospasm in children: effects of asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1819–1823.
31. Cala P (1980) Cell volume regulation by Amphiuma red blood cells. The role of Ca^{+2} as a modulator of alkali metal/ H^{+} exchange. *The Journal of General Physiology* 82:761-84
32. Carroll NG., Mutavdzic S., James AL. (2002) Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patient with asthma. *Thorax* 57, 677-682.
33. Chan CL, Jones RL and Lau HYA (2000) Characterization of prostanoid receptors mediating inhibition of histamine release from anti-IgE-activated rat peritoneal mast cells. *British Journal of Pharmacology* 129, 589-597.
34. Chang L, Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37–40.
35. Chen FH, Samson KT, Miura K, Ueno K, Odajima Y, Shougo T, Yoshitsugu Y, Shioda S (2004) Airway remodelling: a comparison between fatal and nonfatal asthma. *J Asthma* 41:631-638.
36. Church MK, Levi-Schaffer F (1997) The human mast cell. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99(2):155-60
37. Coleman, R. A., Smith, W. L., & Narumiya, S. (1994). International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological Reviews*, 46(2), 205–229.
38. Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F and Ribatti D (2004) The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histology and Histopathology* 19:259-270
39. Davis TL and Sharif NA (2000) Pharmacological characterization of [3H]-prostaglandin E_2 binding to the cloned human EP_4 prostanoid receptor. *British Journal of Pharmacology* 130, 1919-1926.

40. Del, C.A. et al. (2006) Comparative pharmacology of the H₁ antihistamines. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*: 16 (suppl 1), 3-12.
41. Díaz B, Fujishima H, Kanaoka Y, Urade Y, Arm J (2002) Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and IL-6 expression in Mouse bone marrow-derived mast cells by exogenous but not endogenous prostanoids. *J Immunol* 168:1397-1404
42. Ebina M., Takahashi T., Chiba R., Motomiya M. (1993) Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *American Review of Respiratory Diseases* 148, 720-726.
43. Ebina M., Yaegashi H., Chiba R., Takahashi T., Motomiya M., Tanemura M (1990) Hyperreactive site in the airway tree of asthmatic patients revealed by thickening of bronchial muscles. A morphometric study. *American Review of Respiratory Diseases* 141, 1327-1332.
44. Ferry X., Brehin S., Kamel R., Landry Y. (2002) G protein-dependent activation of mast cell by peptides and Basic secretagogues. *Peptides* 23, 1507-1515.
45. Finkelman F., Boyce J., Vercelli D. And Rothenberg M. (2010) Key advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2009. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, 312-8.
46. Fitzgerald SM, Lee SA, Hall K, Chi DS, Krishnaswamy G. (2004) Human lung fibroblasts express IL-6 in response to signaling following mast cell contact. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:585–593.
47. Frossi B, Gri G, Tripodo C and Pucillo C (2010) Exploring a regulatory role for mast cells: 'MCregs'? *Trends in Immunology* 31(3):97-102
48. Galli SJ (1997) Complexity and redundancy in the pathogenesis of asthma: reassessing the roles of mast cells and T cells. *Journal of Experimental Medicine* 186:343-347
49. Galli SJ, Grimaldeston M & Tsai M (2008) Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature Reviews of Immunology* 8:445-454.
50. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M (2005) Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annual Review of Immunology* 23: 749–86.
51. Gauvreau GM, Watson RM, and O'Byrne PM (1999) Protective effects of inhaled PGE₂ on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 31–36

52. Gee K.R., Brown K.A., Chen W-N., Bishop-Stewart J., Gray D., Johnson I. (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium* 27(2), 97-106.
53. Gilfillan AM & Rivera J (2009) The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunological Reviews* 228, 149–169.
54. Gilfillan, A & Tkaczyk, C (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature Reviews Immunology* 6: 218-230.
55. Gillie H, Sharrocks A, Shaw PE. (1992) Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358:414.
56. Gomperts B, Kramer I, Tatham P (2002) Signal transduction. Academic Press, Elsevier Science, 1th Edition USA
57. Goodman & Gilman's (2006) The Pharmacological Basis of Therapeutics - McGRAW-HILL, Medical Publishing Division, 11th Edition USA
58. Goulet J, Pace A, Key M, et al. (2004) E-prostanoid-3 receptors mediate the proinflammatory actions of prostaglandin E₂ in acute cutaneous inflammation. *J Immunol* 173:1321-1326.
59. Grimbaldston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ.(2005) Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant kit W-sh/E-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *The American journal of pathology* 167:835-848.
60. Grinstein S, Cohen S, Goetz JD, Rothstein A (1985) Osmotic and Phorbol Ester-induced Activation of Na⁺/H⁺ Exchange: Possible Role of Protein Phosphorylation in Lymphocyte Volume Regulation. *The Journal of Cell Biology* 101:269-27
61. Grinstein S, Goetz-Smith J, Stewart D, Beresfordl B, Mellors A (1986) Protein Phosphorylation during Activation of Na⁺/H⁺ Exchange by Phorbol Esters and by Osmotic Shrinking: possible relation to cell pH and volume regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 261(17): 8009-8016
62. Grosman N (2007) Comparison of the influence of NSAIDs with different COX-selectivity on histamine release from mast cells isolated from naïve and sensitized rats. *International Immunopharmacology* 7:532-540.
63. Gulliksson M, Palmberg L, Nilsson G, Ahlstedt S, Kumlin M (2006) Release of prostaglandin D₂ and leukotriene C₄ in response to hyperosmolar stimulation of mast cells. *Allergy* 61(12):1473–1479

64. Halliman E, Stapelfeld A, Savage M, Reichman M (1994) 8-chlorodibenz [B,F] [1,4] oxazepine-10 (11H)-carboxylic acid, 2-[3-2(furanylmethyl)thio]-1-oxopropyl] hydrazide (SC51322): a potent PGE₂ antagonist and analgesic. *Bioorg. Med. Chem Lett* 4:509-14
65. Hallsworth MP, Moir LM, Lai D, Hirst SJ. (2001) Inhibitors of mitogen-activated protein kinases differentially regulate eosinophil-activating cytokine release from human airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 164:688–697.
66. Hamada H, Terai M, Kimura H, Hirano K, Oana S, Niimi H. (1999) Increased expression of mast cell chymase in the lungs of patients with congenital heart disease associated with early pulmonary vascular disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160(4):1303-8.
67. Hara M, Matsumori A, Ono K, Kido H, Hwang MW, Miyamoto T, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K, Sasayama S (1999). Mast cells cause apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells in vitro. *Circulation* 100(13):1443-9.
68. Hartert TV, Dworski R, Mellen B, Oates J, Murray JJ, and Sheller J (2000) Prostaglandin E₂ Decreases Allergen-stimulated Release of Prostaglandin D₂ in Airways of Subjects with Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 162(2): 637-640
69. Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S, Horie T (2001) Transforming growth factor- β_1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblast to myofibroblast through c-Jun-NH₂-terminal kinase-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 163:152–157.
70. Herrerias A, Torres R, Serra M, Marco A, Pujols L, Picado C and de Mora F (2009) Activity of the cyclooxygenase 2-prostaglandin-E prostanoid receptor pathway in mice exposed to house dust mite aeroallergens, and impact of exogenous prostaglandin E₂. *Journal of Inflammation* 6:30
71. Holgate ST, Lackie PM, Davies DE, Roche WR, Walls AF (1999) The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodelling in asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 29 (Suppl.2), 90-95.
72. Holgate ST and Polosa R. (2006) The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet* 368: 780-793.
73. Holgate ST and Polosa R. (2008) Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 8(3) 218-230.
74. Irani AM, Schwartz LB. (1994) Human mast cells heterogeneity. *Allergy Proc* 15, 303-308.

75. Jascur T, Gilman J and Mustelin T (1997) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in NFAT activation in T cells. *J Biol Chem* 272:14483-8
76. Johnson G and Lapadat R (2002) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* 298:1911-1912.
77. Kalesnikoff J and Galli SJ (2008) New developments in mast cell biology. *Nature Immunology* 9(11):1215-1222
78. Karin M. (1998). Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann NY Acad Sci* 851:139–146
79. Karin, M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270:16483
80. Kemp, JP. (2003) Recent advances in the management of asthma using leukotriene modifiers. *American journal of respiratory medicine* 2:139-156.
81. Kirshenbaum AS, Akin C, Wu Y, Rottem M, Goff JP, Beaven MA, Rao VK, Metcalfe DD (2003) Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leukemia research* 27(8):677-82.
82. Kuehn HS, Jung MY, Beaven MA, Metcalfe DD, Gilfillan AM (2010) Prostaglandin (PG) E₂ activates and utilizes mTORC2 as a central signalling locus for the regulation of mast cell chemotaxis and mediator release. *Journal of Cell Biochemistry papers in Press*, M110.164772
83. Kunikata T, Yamane H, Segi E, Matsuoka T, Sugimoto Y, Tanaka S, Tanaka H, Nagai H, Ichikawa A, Narumiya A (2005) Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP₃. *Nature Immunology* 6(5): 524-531
84. Lemanske RF. And Busse W. (2010) Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S95-102.
85. Lin, L.-L., M. Wartmann, A. Y. Lin, J. L. Knopf, A. Seth, R. J. Davis. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72:269
86. Lowenstein, C. J., E. W. Alley, P. Raval, A. M. Snowman, S. M. Snyder, S. W. Russell, W. J. Murphy (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*90:973
87. Malek A, Xu Ch, Kim E and Alper S (2007) Hypertonicity triggers RhoA-dependent assembly of myosin-containing striated polygonal actin networks in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1645–C1659

88. Marone G, Florio G, Triggiani M, Petraroli A and Paulis A (2000) Mechanisms of IgE elevation in HIV-1 infection. *Crit Rev Immunol* 20:477-496
89. Marone G, Triggiani M. and de Paulis A. (2005) Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends in Immunology* 26 (1), 25-31.
90. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. (2004) The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59:469–478
91. Mekori YA, Metcalfe DD (1999) Mast cell-T cell interaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104, 517-523.
92. Melillo E, Woolley KL, Manning PJ, Watson RM, O'Byrne PM. (1994) Effect of inhaled PGE₂ on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*; 149: 1138-1141.
93. Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ (2007) Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunology Review* 217, 304-328
94. Mikuni M, Pall M, Peterson CM, Peterson CA, Hellberg P, Brännström M, Richards JS, Hedin L (1998) The Selective Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 Inhibitor, NS-398, Reduces Prostaglandin Production and Ovulation In Vivo and In Vitro in the Rat. *Biology of reproduction* 59, 1077–1083.
95. Mitchison TJ (1995) Evolution of a dynamic cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349(1329):299-304.
96. Moloney E.D., Griffin S., Burke C.M., Poulter L.W., O'Sullivan S. (2003) Release of inflammatory mediators from eosinophils following a hyperosmolar stimulus. *Respiratory Medicine* 97, 928-932.
97. Mukaida, N., Y. Mahe, K. Matsushima (1990) Cooperative interaction of NF- κ B and C/EBP-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by proinflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 265:21128
98. Mullol J, Fernandez-Morata JC, Roca-Ferrer J, Pujols L, Xaubet A, Benitez P, et al (2002) Cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 expression is abnormally regulated in human nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*; 109:824-30.
99. Murakami M, et al (2003) Cellular prostaglandin E₂ production by membrane-bound prostaglandin E₂ synthase-2 via both cyclooxygenases- 1 and -2. *The Journal of biological chemistry* 278:37937–37947

100. Murakami M, Kudo I (2004) Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Progress in Lipid Research* 43:3–35
101. Nagai H. (2008) Prostaglandin as a Target Molecule for Pharmacotherapy of Allergic Inflammatory Diseases. *Allergology International* 57:187-196.
102. Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto, S. Akira. (1993) Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2207
103. Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999) Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiology Reviews* 79:1193-1226.
104. Natsuka, S., S. Akira, Y. Nishio, S. Hashimoto, T. Sugita, H. Isshiki, T. Kishimoto (1992) Macrophage differentiation specific expression of NF-IL6, a transcription factor for IL-6. *Blood* 79:460
105. Nauta AJ., Engels F., Knippels LM., Garssen J., Nijkamp FP., Redegeld FA. (2008) Mechanisms of allergy and asthma. *European Journal of Pharmacology* 585, 354-360.
106. Newton R, Holden N. (2003) Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase: potential as anti-inflammatory agents in asthma? *BioDrugs*.17(2):113-29.
107. Nguyen M., Solle M., Audoly L.P., Tilley S.L., Stock J.L., McNeish J.D., Coffman T.M., Dombrowicz D. and Koller B.H. (2002) Receptors and Signaling Mechanisms Required for Prostaglandin E₂-Mediated Regulation of Mast cell Degranulation and IL-6 Production. *The Journal of Immunology* 169, 4586-4593.
108. Nishigaki N, Negishi M, & Ichikawa A (1996) Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP₂ and EP₄, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Molecular Pharmacology*, 50(4), 1031–1037
109. O'Sullivan S, Roquet A, Dahlén B, Larsen F, Eklund A, Kumlin M, O'Byrne PM, Dahlén SE. (1998) Evidence for mast cell activation during exercise induced bronchoconstriction. *Eur Resp J* 12:2; 345-350.
110. Okano M., Fujiwara T., Haruna T., Kariya S., Makihara S., Higaki T., Nishizaki K. (2009) Prostaglandin E₂ suppresses staphylococcal enterotoxin-induced eosinophilia-associated cellular responses dominantly through an E-prostanoid

- 2-mediated pathway in nasal polyps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, 868-74.
111. Okayama Y, Ra Ch, Saito H. (2007) Role of mast cells in airway remodeling. *Current Opinion in Immunology* 19:687–693.
 112. Pavord ID, Wong CS, Williams J, and Tattersfield AE. Effect of inhaled prostaglandin E₂ on allergen-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 148: 87–90, 1993.
 113. Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, Gallelli L et al (2005) Mitogen-Activated Protein Kinases and Asthma. *Journal of Cellular Physiology* 202:642-653.
 114. Pérez-Novo CA, Watelet JB, Claeys C, Van Cauwenberge P, Bachert C. (2005) Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol*; 115:1189-96.
 115. Pertz, O (2010) Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci* 123: 1841-50
 116. Phipps S, Benyahia F, Ou TT, Barkans J, Robinson DS, Kay AB (2004) Acute allergen-induced airway remodeling in atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:626-632.
 117. Picado C, Fernancez-Morata JC, Juan M, Roca-Ferrer J, Fuentes M, Xaubet A, et al (1999) Cyclooxygenase-2 mRNA is downexpressed in nasal polyps from aspirinsensitive asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*; 160:291-6.
 118. Pliss LB, Ingenito EP, Ingram RH, Pichurko B.(1990) Assessment of bronchoalveolar cell and mediator response to isocapnic hyperpnea in asthma. *Am Rev Respir Dis* 142:73-78.
 119. Prussin C. and Metcalfe DD. (2006) 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 117, S450-56.
 120. Pundir, P & Kulka, M. (2010) The role of G protein-coupled receptors in mast cell activation by antimicrobial peptides: is there a connection? *Immunology and Cell Biology* 88: 632–640.
 121. Rådinger M, Jensen BM, Kuehn HS, Kirshenbaum A, Gilfillan AM. (2010) Generation, isolation, and maintenance of human mast cells and mast cell lines derived from peripheral blood or cord blood. *Current protocols in immunology* Aug; Chapter 7: Unit 7.37.
 122. Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM et al. (1994) Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Molecular Pharmacology* 46:213-20

123. Robinson DS (2004) The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114(1): 58–65.
124. Robinson DS., Hamid Q., Ying S., Tasicopoulos A., Barkans J., Bentley AM et al., (1992) Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *New England Journal of Medicine* 326, 298-304.
125. Saito H., Okayama Y. editors. (2005) Mast cells in Allergic Diseases. *Chemical Immunology and Allergy*. Vol.87. Suiza: Karger.
126. Salamon P, Shoham NG, Gavrieli R, Wolach B, Mekori YA (2005) Human mast cells release Interleukin-8 and induce neutrophil chemotaxis on contact with activated T cells. *Allergy* 60(10): 1316–1319
127. Sandulache VC, Singh T, Li-Korotky HS, et al (2009) Prostaglandin E₂ is activated by airway injury and regulates fibroblast cytoskeletal dynamics. *The Laryngoscope* 119:1365-1373
128. Saranz R. (2001) Asma inducida por ejercicio. *Archivos de Alergia Inmunología Clínica* 32: S89-S99.
129. Seldin DC, Adelman S, Austen KF, Stevens RL, Hein A, Caulfield JP, Woodbury RG.(1985) Homology of the rat basophilic leukemia cell and the rat mucosal mast cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(11):3871-5.
130. Serhan Ch. and Levy B. (2003) Success of prostaglandine E₂ in structure-function is a challenger for structure-based therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15), 8609-11.
131. Sestini P, Armetti L, Gambaro G, Pieroni MG, Refini RM, Sala A, Vaghi A, Folco GC, Bianco S, and Robuschi M. (1996) Inhaled PGE₂ prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE₄ excretion in aspirin- sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 572–575.
132. Sheller JR, Mitchell D, Meyrick B, Oates J and Breyer R (2000) EP₂ receptor mediates bronchodilation by PGE₂ in mice. *J Appl Physiol* 88: 2214–2218
133. Soderling, S.H., and Beavo, J.A. (2000) Regulation of cAMP and cGMP signaling: New phosphodiesterases and new functions. *Current Opinion in Cell Biology* 12:174-179.
134. Sonnenburg WK, Zhu JH & Smith WL (1990) A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit

- cortical collecting tubule cell. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(15), 8479–8483.
135. Stack E. and DuBois R. (2001) Regulation of cyclo-oxygenase-2. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 15, 787-800.
 136. Sugimoto Y, Naruyima S. (2007) Prostaglandin E receptors. *The Journal of biological chemistry* 282:11613-7.
 137. Suzuki Y., Yoshimura T., Matsui T., Inoue T., Niide O., Nunomura S. and Ra Ch. (2003) FcεRI Signaling of Mast Cells Activates Intracellular Production of Hydrogen Peroxide: Role in the Regulation of Calcium Signals. *The Journal of Immunology* 171, 6119-6127.
 138. Suzuki Y., Yoshimaru T., Inoue T. and Ra Ch. (2006) Mitochondrial Ca²⁺ flux is a critical determinant of the Ca²⁺ dependence of mast cell degranulation. *Journal of Leukocyte Biology* 79:508-518
 139. Syntichaki P and Tavernarakis N (2003) The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nature Reviews Neuroscience* 4: 672-684
 140. Vassalli P (1992) The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. *Annual Review of Immunology* 10: 411-452
 141. Versteeg HH, Nijhuis E, van den Brink GR, Evertzen M, Pynaert GN, van Deventer SJ, Coffey PJ & Peppelenbosch MP (2000) A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein. *The Biochemical Journal*, 350(Pt. 3), 717–722.
 142. Wang XS & Lau HYA (2006) Prostaglandin E₂ potentiates the immunologically stimulated histamine release from human peripheral blood-derived mast cells through EP₁/EP₃ receptors
 143. Wardlaw AJ., Brightling CE., Green R., Wolt,amm G., Bradding P. and Pavord ID. (2002) New insights into the relationship between airway inflammation and asthma. *Clinical Science* 103, 201-211.
 144. Wilkinson MG & Millar JBA (1998) SAPKs and transcription factors do the nucleocytoplasmic tango, *Genes & Development* 12, 1391-1397.
 145. Woodman L., Siddiqui S., Cruse G., Sutcliffe A., Saunders R., Kaur D., Bradding P. and Brightling C. (2008) Mast cells promote airway smooth muscle cell differentiation via autocrine up-regulation of TGF-β1. *The Journal of Immunology* 181, 5001-5007.

146. Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dümmler B, Hynx D and Hemmings BA (2004) Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochemical Society Transactions* 32(2):350-354.
147. Yedgar S., Krinsky M., Cohen Y., Flower RJ. (2007) Treatment of inflammatory diseases by selective eicosanoid inhibition: a double-edged sword? *Trends in Pharmacological Sciences* 28 (9): 459-464.
148. Zhang, Y., W. N. Ron (1993). Regulation of the interleukin-1b (IL-1b) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor IL-6 motifs. *Mol. Cell. Biol.*13:3831
149. <http://epidemiologiamolecular.com/citocinas/>
150. <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3>