



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN INMUNOLOGIA
E INFECTOLOGIA DEL HOSPITAL DE INFECTOLOGIA. CMN
"LA RAZA" I.M.S.S.

ANALISIS MOLECULAR DEL RECEPTOR 1 PARA
EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA
EN CELULAS CEBADAS.

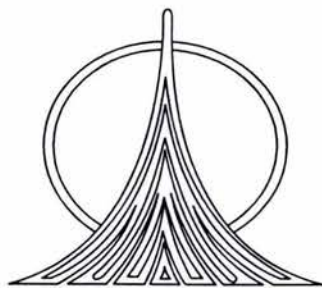
T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

C. BLANCO FLORES JUAN PABLO



Unidad en la Diversidad
Zaragoza Frente al Siglo XXI

ASESOR EXTERNO: DRA. GLORIA MA. CALDERON RODRIGUEZ

ASESOR INTERNO: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

MEXICO, D.F.

JUNIO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

*FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"*

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA
E INFECTOLOGÍA DEL HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA. CMN
"LA RAZA" I.M.M.S.

ANÁLISIS MOLECULAR DEL RECEPTOR 1
PARA EL FACTOR DE NECROSIS
TUMORAL ALFA EN CÉLULAS CEBADAS.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA.

C. BLANCO FLORES JUAN PABLO.

ASESOR EXTERNO: DRA. GLORIA MA. CALDERÓN
RODRÍGUEZ.

*INVESTIGADOR ASOCIADO DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INFECTOLOGÍA
E INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA
RAZA".*

ASESOR INTERNO: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

DEDICATORIA

**A DIOS PADRE por hacerme a su semejanza.
Por permitirme compartir con ustedes ahora.
Por iluminar nuestro camino con bendiciones.**

**A JOSE TIMOTEO ALBINO Y ROSA
MARÍA mis hermosos Padres:
Por haberme dedicado su amor y
comprensión.
Por sacrificar su vida para hacerme crecer
como ser humano.
Por ser los mejores Padres que haya podido
otorgarme Dios Padre.**

**A mis HERMANOS:
Irma Carolina, Jesús Albino y Leonardo:
Por formar parte de nuestra gran Familia.
Por compartir su bendita sangre conmigo.
Por su apoyo incondicional y eterno.**

**A Lluvia mi Hermosa Compañera:
Por brindarme tu apoyo y comprensión,
para llegar al éxito en esta etapa de mi
vida.
Por compartir conmigo la bendición de ser
Padres.
Por dedicarme tu valerosa atención y
cuidados.**

**A mis Amigos y Compañeros de la Unidad de Investigación por
dedicarme su conocimiento y ayuda para llegar a la conclusión de
mi Titulación.**

**A mi Asesora Dra Gloria María Calderón Rodríguez por brindarme
su apoyo, comprensión y dedicación para la realización de este
trabajo de investigación.**

**A mi UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por
darme la formación académica para seguir creciendo como
Profesionista competitivo en nuestra sociedad.**

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	5
II. RESUMEN.....	7
III. INTRODUCCIÓN.....	8
IV. MARCO TEÓRICO.....	9
ANTECEDENTES.....	9
1. Células cebadas.....	10
a) Ontogenia.....	12
2. Activación de las células cebadas.....	13
a) Dependiente de IgE.....	14
b) Independiente de IgE.....	14
3. Mediadores de las células cebadas.....	14
a) Histamina.....	15
b) Proteinasas.....	15
c) Citocinas.....	15
4. Factor de necrosis tumoral alfa.....	16
5. Familia del factor de necrosis tumoral.....	16
6. Familia del receptor para el factor de necrosis tumoral.....	16
7. Receptores 1 y 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR1 y TNFR2).....	18
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
VI. OBJETIVOS.....	21
VII. HIPÓTESIS.....	21
VIII. METODOLOGIA.....	22
1. Material.....	22

a) Vidriería.....	22
b) Equipo.....	22
c) Reactivos y soluciones.....	23
2. Método.....	23
a) Células cebadas.....	23
a) Extracción de RNA.....	23
b) RT-PCR.....	24
c) Purificación.....	25
d) Cuantificación.....	26
e) PCR de secuenciación.....	27
f) Secuenciación.....	27
IX. RESULTADOS	28
X. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	32
XI. CONCLUSIONES	34
XII. REFERENCIAS	35

ABREVIATURAS.

aa	aminoácidos
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CR3	receptor 3 de complemento
FcER	receptor para IgE
FCER1	receptor de alta afinidad para IgE
Fim H	fimbria H
GM-CSF	factor estimulador de colonias para granulocitos y macrófagos
HRF	factor liberador de histamina
HRMC	hibridoma celular que expresa un fenotipo de células cebadas de mucosa
iC3b	inhibidor del fragmento 3b de complemento
IgE	inmunoglobulina E
IgG	inmunoglobulina G
IL	interleucina.
INF	interferon
KDa	kilodalton
LIF	factor inhibidor de leucemia
LT	linfotoxina
MAPK	quinasas de proteínas de activación mitogénica
MIP-1alfa	proteína inflamatoria de macrófagos
NFkB	factor nuclear kappa B
NGFR	receptor del factor de crecimiento nervioso
pb	pares de bases
RANKL	ligando activador del receptor de NFkB
RANTES	activación y regulación de células T secretadas y expresadas

RNA	ácido ribonucleico
RNA^m	RNA mensajero
RT-PCR	retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
SCF	factor estimulador de colonias
TCA	gene de estimulación de células T
TNF	factor de necrosis tumoral
TNFR1	receptor 1 para el factor de necrosis tumoral
TNFR2	receptor 2 para el factor de necrosis tumoral
TRAIL	ligando relacionado al TNF
W/W^v	mutación en el receptor para el factor estimulador de colonias
WBB6F1-W/W^v	ratones con defecto en la proteína c-kit, el receptor para el factor estimulador de colonias

RESUMEN.

Las células cebadas están ampliamente distribuidas en las mucosas y en el tejido conectivo, y participan activamente en la respuesta inmune una vez que son activadas, secretando una gran variedad de mediadores de la inflamación. Estas células pueden ser activadas vía receptores.

El objetivo de este trabajo por lo tanto, es la descripción de la secuencia del RNA mensajero del receptor 1 para el TNF alfa (TNFR1) en las células cebadas HRMC, línea celular con fenotipo de células cebadas de mucosa. A estas células se les extrajo el RNA y posteriormente se realizó una reacción de retrotranscripción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando los siguientes iniciadores 5'-ACCAAGTGCCACAAAGGAACC-3' y 5'-TACACACGGTGTCTGTTTCTCC-3', los cuales codifican para el dominio extracelular de TNFR1, posteriormente se realizó la secuenciación del cDNA amplificado. El análisis de la secuenciación mostró un 100% de homología entre las células cebadas de la línea HRMC, con lo reportado en la línea C6 de células de glioma de rata. Por lo que se concluye que las células cebadas HRMC, presentan el RNA mensajero para el receptor del TNFR1.

INTRODUCCIÓN.

Las células cebadas son consideradas como células efectoras primordiales en enfermedades alérgicas por su gran capacidad para responder rápidamente a la provocación mediante un estímulo y su habilidad para liberarse en grandes cantidades de mediadores pro inflamatorios preformados y recién generados **(1)**

La generación de citocinas por las células cebadas es crucial en la iniciación de una respuesta alérgica. Una de las citocinas principalmente liberada es el TNF alfa, la cual es una potente citocina que tiene un papel protector en la peritonitis séptica, que activa el transporte de neutrófilos y macrófagos hacia el sitio de infección bacteriana **(2, 3)** En las células cebadas el TNF alfa se encuentra almacenado en gránulos citoplasmáticos el cual es liberado, junto con la histamina y otros mediadores preformados a unos minutos de suceder una estimulación antigénica **(4)** Las células cebadas pueden liberar TNF alfa inmediatamente después de una estimulación. La liberación de TNF alfa se puede inducir por diversos estímulos, como en el caso específico de exposición a la toxina A de *Clostridium difficile*, **(5)** Después de una larga exposición a la toxina se afecta la liberación de mediadores y también la supervivencia de la célula. Estos resultados sugieren que las células cebadas pueden participar en la respuesta inmune inicial frente a la toxina A de *Clostridium difficile*.

El TNF alfa tiene un importante papel en la inmunorregulación de procesos vitales de la célula por lo tanto su participación en la inducción de muerte celular por apoptosis en estas células es importante, además de que también es necesario dilucidar los mecanismos mediante los cuales, ocurre este fenómeno.

El mecanismo por el cual actúa el TNF alfa es mediante su enlace a sus receptores **(6)**, TNFR1 (55/60kDa) y TNFR2 (75/80). El cDNA de TNFR1 ha sido secuenciado y caracterizado en humanos, roedores, bovinos y felinos **(7, 8, 9)** sin embargo aunque se presume de su existencia, aún no ha sido caracterizado en las células cebadas. La relevancia de poder identificar el receptor TNFR1 en las células cebadas es que quedaría establecido, que esta célula posee receptores para el TNF, además de que la unión a su receptor puede participar en la señalización celular en procesos como sobrevivencia y apoptosis.

MARCO TEÓRICO.

ANTECEDENTES.

En la membrana de los epitelios de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario existen mecanismos de respuesta inmune a la invasión contra microorganismos patógenos. Estos mecanismos forman parte tanto de la respuesta inmune innata como de la respuesta inmune adquirida. Ambas presentan diversos componentes que les permiten realizar una amplia gama de funciones, destacándose de forma importante el componente celular. Entre las células que se consideran parte de la fase efectora de la respuesta inmune tenemos principalmente linfocitos, los macrófagos y las células cebadas.

CÉLULAS CEBADAS.

Las células cebadas son células efectoras de la respuesta inmune que han sido predominantemente asociadas a fenómenos de hipersensibilidad inmediata y alergia. Las células cebadas son células granulares con numerosas vacuolas y gránulos en donde se almacenan diversas moléculas mediadoras preformadas, y muestran núcleos grandes basofílicos. La membrana de las células cebadas está repleta de receptores que incluyen a moléculas de reconocimiento y enlace con las bacterias o toxinas. Debido a su amplia distribución en el organismo se considera que estas células participan activamente en la respuesta inflamatoria **(10)** Aunque la participación de las células cebadas en la patogénesis de las infecciones bacterianas no ha sido muy estudiada, la producción de mediadores de la inflamación sugiere que estas células pueden tener un papel preponderante en la respuesta inflamatoria frente a agentes infecciosos **(11, 12)** Se ha reportado por ejemplo, que las células cebadas pueden unirse específicamente a las FimH de *Escherichia coli* y otras enterobacterias **(13)**, fagocitarlas y destruirlas en sus vacuolas acidificadas a través de la liberación de aniones superóxido. Así mismo en experimentos con ratones WBB6F1-W/W^v (W/W^v) infectados con *Klebsiella pneumoniae*, Malaviya y cols **(13)**, observaron que la liberación de TNF alfa por las células cebadas modula el flujo de neutrófilos para la supresión de la bacteria, eliminando la infección con base en una respuesta inmune innata, independiente de anticuerpos específicos. Las células cebadas pueden ser localizadas en superficies epiteliales y mucosas de tracto genitourinario, gastrointestinal y respiratorio. Las concentraciones estimadas de las células cebadas oscilan entre 500 a 4000 por mm³ en intestinos, 7000 a 12000 en piel y 20000 por mm³ en tracto gastrointestinal **(14)** Debido a que los anteriores son portales para

infecciones, la célula cebada puede ser una de las primeras células en actuar contra la invasión bacteriana o parasitaria y producir un proceso inflamatorio. Así mismo las células cebadas presentan dos mecanismos de reconocimiento microbiano: opsonización dependiente y opsonización independiente **(14)** Se requiere de componentes del suero u otros componentes solubles del huésped que funcione como moléculas de enlace las cuales unen simultáneamente a las células cebadas a la bacteria. La mejor forma por la cual se produce la opsonización es mediante la IgE, la cual media el enlace de la célula cebada a parásitos como los helmintos. El helminto evoca una respuesta inmune de tipo humoral específica en el huésped la cual involucra la secreción de un gran número de anticuerpos IgE **(15)** Estos anticuerpos pueden unirse a la superficie de las células cebadas porque tienen receptores para IgEs (FcER) presentes sobre las membranas de las células cebadas. Existen moléculas de IgE que son específicas para los helmintos, los cuales promueven el enlace de la célula cebada al parásito **(16)** las células cebadas también poseen receptores para otras opsoninas incluyendo el FcγR, el receptor para IgG, CR3 y el receptor para la iC3b del complemento **(17)** En las interacciones opsoninas independientes, los receptores específicos sobre la superficie de las células cebadas y los ligandos complementarios sobre la superficie celular de la bacteria son los involucrados. Esta interacción ocurre mediante el acoplamiento del receptor de manosa sobre la superficie de la célula cebada a organelos filamentosos de adhesión de bacterias como *E. coli* y otras enterobacterias con fimbrias de tipo 1 **(18)**

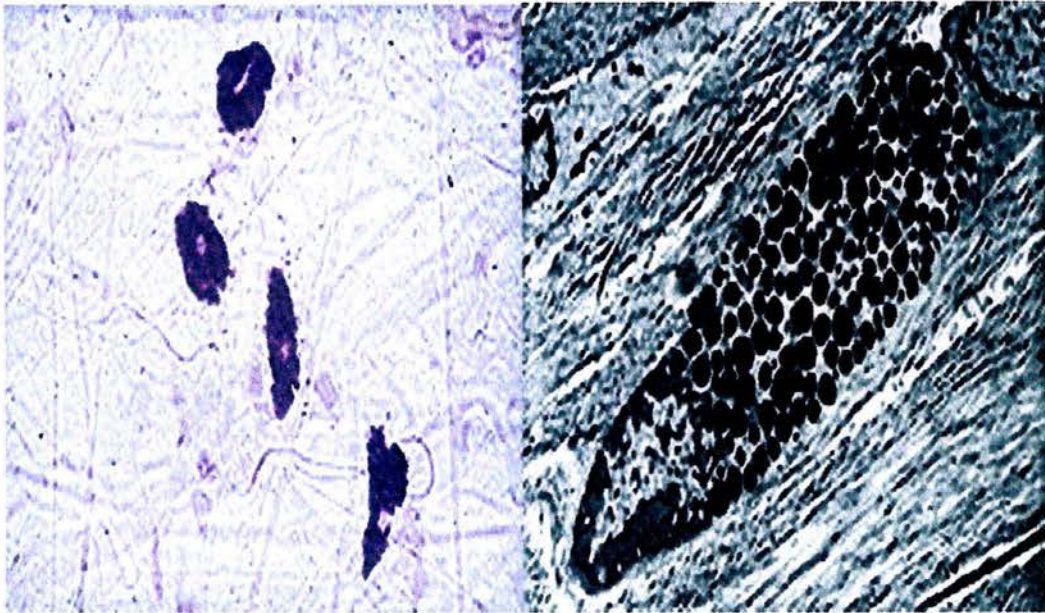


Figura 1

Figura 2

Figura 1. Células cebadas de tejido conectivo observadas por microscopía de luz (100x). Caracterizadas por presentar citoplasma con gránulos basófilos que se tiñen metacromáticamente con azul de toluidina. Su núcleo es esférico y está situado en el centro de la célula. **Figura 2.** Ultraestructura de la célula cebada mostrando gran cantidad de gránulos.

ONTOGENIA.

Las células cebadas se derivan de células madres hematopoyéticas (2) Surgen de sus progenitores y después de completar su maduración, adquieren una diversidad fenotípica, para movilizarse a diferentes tejidos periféricos. En el caso de las células cebadas humanas, al parecer se originan a partir de células progenitoras CD34+. Es importante notar que la maduración de las células cebadas en tejidos periféricos está básicamente influenciada por factores microambientales (19, 20, 21, 22) Las células progenitoras de células cebadas se localizan en médula

ósea y tejidos periféricos, como sangre, mucosa intestinal, nódulos linfáticos y cavidad peritoneal y de ahí migran al tejido blanco. Los marcadores celulares para los progenitores jóvenes se han descrito como Thy-1^{lo} y c-kit^{hi} **(23)** En el humano, las células cebadas progenitoras que encontramos en circulación se han definido como c-kit⁺, CD34⁺, Iy⁻, CD14⁻ y cd17⁻ **(24)** Su presencia en estos tejidos depende de la acción de la tirosin-cinasa de superficie celular, c-kit, y del factor estimulador de colonias (SCF) **(2)** Las células cebadas se diferencian de los basófilos en que las células cebadas se localizan en tejido conectivo o en mucosas y los basófilos en sangre y vasos linfáticos. Se han caracterizado dos diferentes fenotipos de células cebadas dependiendo de su localización, contenido de proteasas y reactividad **(25)** Por su localización se les ha denominado: células cebadas de mucosas (CC_M) y células cebadas de tejido conectivo (CC_C) presentando diferencias entre ellas.

ACTIVACION DE CÉLULAS CEBADAS.

La activación de las células cebadas se lleva a cabo mediante 2 tipos de mecanismos: a) por activación antigénica dependiente de IgE, en donde los receptores de alta afinidad para IgE (FcεRI) en las células cebadas tienen un papel muy importante y b) por mecanismos independientes de IgE los cuales activan vías peptidérgicas y se presentan más en células cebadas de "serosas", como peritoneo y piel **(26)**

La activación de las células cebadas puede ser mediante los siguientes mecanismos:

1. Dependiente de IgE

La alta o baja afinidad de los receptores para IgE se presenta en las células cebadas, ocurriendo cuando existe un entrecruzamiento con el antígeno lo que produce la activación de la célula cebada por las IgE, dependiendo de la naturaleza de la célula cebada **(27)**

2. Independiente de IgE

En las interacciones independientes de IgE se presenta por la unión de los ligandos a su receptor. La activación de las células cebadas puede darse por la presencia de antígenos de forma directa como toxinas o neuropéptidos.

MEDIADORES DE CÉLULAS CEBADAS.

Como se ha mencionado las células cebadas contienen numerosos gránulos en su citoplasma en donde se almacenan enzimas características de estas células y mediadores preformados. Los mediadores de células cebadas juegan un papel importante en las reacciones alérgicas e inflamatorias no sólo por su acción directa sobre músculo liso, epitelios y endotelio, sino debido a que pueden activar y reclutar a otras células efectoras del sistema inmune, así como amplificar y regular la respuesta inflamatoria. Los mediadores de las células cebadas pueden dividirse en tres categorías: mediadores preformados, mediadores sintetizados de novo y citocinas **(2)**

Los mediadores producidos por la célula cebada se dividen en dos clases: a) mediadores preformados y que generalmente son liberados de forma inmediata a la estimulación, entre los cuales se

encuentran: la histamina, la heparina y proteasas de serina, y b) mediadores que son sintetizadas *de novo* cuando las células son estimuladas, como los leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos **(28)** Dependiendo de la naturaleza del agonista, los productos de las células cebadas son liberados por diferentes mecanismos de exocitosis.

1. Histamina.

La histamina es un mediador almacenado en los gránulos de las células cebadas **(29)** Cuando las células cebadas son activadas, la histamina es secretada al medio ambiente circundante, pero tiene un periodo de vida corto en la circulación. La liberación de histamina puede ocurrir mediante factores de liberación de histamina (HRF), derivados de mononucleares, eosinófilos y neutrófilos.

2. Proteinasas.

Las proteinasas son abundantes en las células cebadas y representan cerca del 50 % de la proteína celular **(29)** entre ellas destacan la quimasa, triptasa, serin proteasas y carboxipeptidasa. En células cebadas de peritoneo de roedores se expresan diferentes formas glicosiladas de quimasas, proteinasa de rata 1 y 5, carboxipeptidasa A. En las células cebadas de mucosa intestinal se expresa únicamente la quimasa, proteinasa de rata 2 **(30)**

3. Citocinas.

Entre las citocinas **(14, 15, 29, 31)** que secretan las células cebadas se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), MIP-2, INF gama, ciclosporina A, factor inhibidor de leucemia (LIF), factor estimulador de colonias para granulocitos-macrófagos (GM-CSF) También las citocinas, IL-1, 3, 6, 8, 10, 12 y 13, FEC-GM, y algunas

quimiocinas como MCP-1, MIP-1alfa y RANTES lo cual indica que estas células tienen un potencial para provocar respuestas específicas en las células T y células B además de que tiene propiedades regulatorias inmunes en la activación vía NFκB **(32)**

TNF ALFA

Una de las principales citocinas liberada por las células cebadas el TNF alfa, la cual es un mediador inflamatorio con múltiples funciones biológicas **(31)** Esta tiene una peso molecular de 17 Kda. Es comúnmente producida por macrófagos y linfocitos. Aparte de su selectividad para participar en procesos tumorales, puede actuar como un mitógeno y es un importante mediador en la respuesta inmune **(33, 34)** En las células cebadas el TNF alfa se encuentra almacenado en gránulos citoplásmicos y puede ser liberado junto con la histamina y otros mediadores preformados después de una estimulación antigénica, sugiriendo un importante rol en procesos inflamatorios **(31)**

FAMILIA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL.

En 1984 **(35)**, dos formas del TNF, TNF alfa y TNF beta o linfotoxina fueron aislados de macrófagos activados y de células T, respectivamente. Después de su identificación, estas proteínas resultaron ser representativas de una superfamilia de ligandos formada por: TNF, LT, ligando de Fas (CD95L), OX40, CD40L, CD27L, CD30L, 41BBL, APO 3L/TWEAK, APO-2L/TRAIL y RANKL **(2, 17)** La mayoría de estos ligandos son proteínas de membrana de tipo 2.

FAMILIA DEL RECEPTOR DEL TNF.

El factor de necrosis tumoral alfa es una potente molécula multifuncional producida por los macrófagos, células T **(36)** y algunas células de epitelio tumoral. Tiene un alto rango de efectos biológicos entre los cuales destacan: proliferación normal de células, ejerce efectos pro inflamatorios y de citotoxicidad y es finalmente una molécula reguladora de la respuesta inmune **(37)** La activación del TNF se lleva a cabo mediante la unión a sus receptores, estos se encuentran distribuidos en la superficie de numerosas células. Los miembros de la familia del receptor para el TNF tienen actividad pleiotrópica. Los efectos pleiotrópicos de TNF alfa sobre la función celular son muy importantes y se ha sugerido que pueden existir mecanismos para modular la actividad de esta citocina **(7)** Existe un singular interés para dilucidar estos mecanismos y para reconocer a que nivel molecular pueden actuar como mecanismo de defensa para el huésped. Dependiendo del tipo celular y de otras señales que se reciben de otras células, estos receptores pueden inducir a la proliferación, supervivencia y muerte celular **(38, 39)** Estos receptores son caracterizados por su homología en su región extracelular conteniendo de dos a seis copias de residuos de cisteína en el dominio de enlace-ligando. Esta familia es típicamente formada por un complejo trimérico o multimérico estabilizado por enlaces de intracisteína disulfuro los cuales están formados en los dominios ricos de cisteína de subunidades de miembros individuales **(40)** Entre los miembros de esta familia de receptores se encuentran: TNFR1 (p55), TNFR2 (p75), TNF-RP, OX-40, 4-BB, CD40, CD30, CD27, NGFR, CAR1, DR3, DR4, DR5 **(2)**

RECEPTORES 1 Y 2 DEL TNF (TNFR1 Y TNFR2)

Dos distintos subtipos de receptores para el TNF fueron identificados en células epiteliales y mieloides **(38)** La demostración definitiva de la existencia de ambos receptores para el TNF fue la clonación y exposición de los genes correspondientes. El cDNA del receptor de 55 KDa humano, nombrado TNFR1, fue identificado con oligonucleótidos derivados de la secuencia del receptor purificado **(41)** La secuencia de aminoácidos revela a un receptor de 460 aminoácidos (aa) de la membrana, un dominio extracelular de 182 aa y un dominio intracelular de 221 aa. La discrepancia entre el tamaño molecular predicho (47.5 KDa) y el observado (55 KDa) se debe probablemente a los sitios de glucosilación. El receptor de 75 KDa de cDNA humano fue clonado y directamente expresado usando TNF marcado radioactivamente. Este receptor presenta una membrana de 439 aa, un dominio extracelular de 235 aa y un dominio intracelular de 174 aa **(42)** Los valores de constantes de disociación para el TNFR1 y el TNFR2 son de aproximadamente de 0.5 y 0.1 nM respectivamente **(41, 42)** El TNFR1 de ratón es 64% idéntico a su contraparte humana y el TNFR2 lo es en un 62 % idéntico al TNFR2 humano. El TNFR1 es más conservado en su dominio extracelular (70% de identidad) mientras que el TNFR2 es más conservado en su dominio intracelular (73% de identidad) El TNFR1 y el TNFR2 humanos presentan una homología del 28 % en su dominio extracelular, equivalente con otros miembros de la familia del receptor para el TNF **(43)** Existe una ausencia completa de homología entre los dominios intracelulares de los dos receptores, lo cual sugiere que ambos desencadenan diferentes eventos de señalización **(40)** Estudios con anticuerpos agonistas del receptor murino han demostrado que los dos receptores tienen diferentes actividades de señalización para el TNF. El TNFR1 es una molécula

que se considera el prototipo de receptor membranal y que principalmente es la responsable de iniciar diversos procesos de señalización que pueden llevar a fenómenos de apoptosis o en su contraparte a procesos de sobrevivencia celular, mientras que el TNFR2 es el responsable de la señalización para la proliferación de timocitos primarios y de líneas de células T citotóxicas (43) De forma general podemos concluir que después de la unión al receptor los miembros de la Superfamilia del TNF pueden mediar procesos como apoptosis, sobrevivencia, diferenciación o proliferación celular a través de diferentes vías de activación que involucran diversas moléculas mediadoras como NFkB, Jun cinasa MAPK y CD95 siendo esta unión de vital importancia para la homeostasis celular (44, 45)

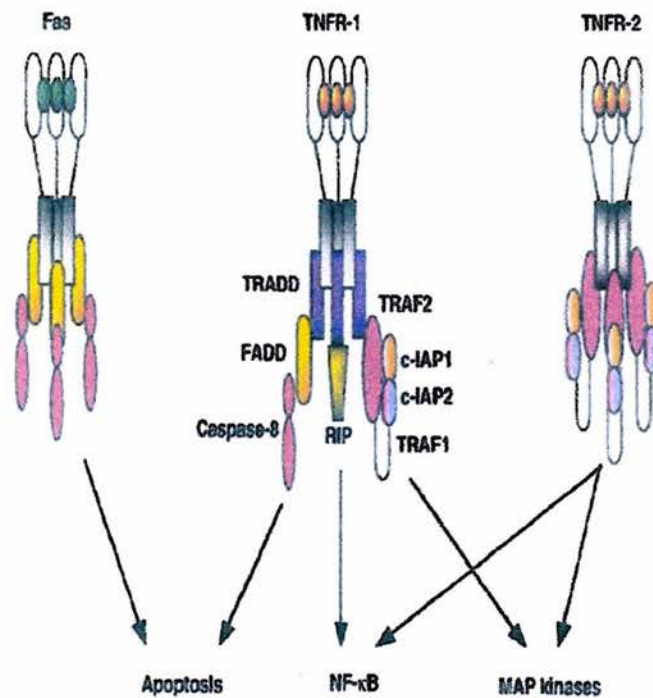


Figura 3. Receptores de Fas, TNFR1 y TNFR2 que señalan los caminos del transducción que conducen a la muerte inducida por la activación de la célula (Figura 3)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las células cebadas pueden presentar muerte celular por apoptosis, sin embargo los mecanismos mediante los cuales se induce este proceso aún no se conocen. Por lo tanto, la participación del TNF alfa liberado por las células cebadas ante la exposición a la toxina A de *Clostridium difficile*, y más específicamente de su receptor (TNFR1) es importante para poder dilucidar si esta molécula participa en este tipo de procesos. El análisis molecular del RNAm del receptor 1 para el factor de necrosis tumoral alfa en células cebadas es un paso importante para predecir la existencia de éste receptor y su posible participación en la respuesta inmune por las células cebadas en mecanismos que conduzcan a la apoptosis celular.

OBJETIVOS.

1. Identificar la presencia del RNAm del receptor 1 para el factor de necrosis tumoral alfa en las células cebadas.
2. Establecer la secuencia genómica del RNAm del TNFR1 en las células cebadas y compararla con la secuencia genómica en otros tipos celulares.

HIPÓTESIS.

La activación de las células cebadas por la toxina A de *Clostridium difficile* induce la producción de citocinas como el TNF alfa. Las células cebadas presentan en su superficie receptores para el Factor de Necrosis Tumoral alfa, específicamente para el TNFR1 que puede ser modulado por el TNF secretado por la misma célula.

METODOLOGÍA.

Material.

Vidriería

Filtro Nalgene

Frascos de Roux de 250 mL

Cajas de petri de plástico

Frascos Pyrex de 250 mL con tapón de rosca

Pipetas graduadas desechables de 1, 5 y 10 mL

Micropipetas Finnipipette de 0.2-2, 0.5-10, 20-200 y 100-1000 μ L

Tubos eppendorf de 0.5 mL

Tubos eppendorf de 1.5 mL

Puntas

Gasas

Gradilla

Equipo

Incubador NUAIRE US Autoflow de CO₂

Campana de flujo laminar NUAIRE de grado 2

Agitador Vortex gene-2

Baño maría Neslab RTE-111

Termociclador Biometra de gradientes

Camara kodak EDAS 290

Secuenciador ABI PRISM 100. Modelo 377

Centrifugadora Speed Vac

Camara de electroforesis Horizon 58

Fluorómetro

Reactivos y Soluciones

Medio RPMI 1640 complementado al 5 %

Se miden 55 mL de medio RPMI 2x, 5 mL de suero fetal bovino al 10 %, 1 mL de bicarbonato de sodio al 7.5 %, 1 mL de HEPES 2 M, 1 mL de L-glutamina 200 mM, 1 mL de antibióticos 100X y 36 mL de agua esteril, para una solución final de 100 mL

Trizol

Cloroformo al 100%

Isopropanol al 100% Etanol al 75% preparado con H₂O-DEPEC al 0.01%

Penicilina-estreptomicina 100X

L-glutamina 200mM

HEPES 2 M

Bicarbonato de sodio al 7.5 %

Método.

Células Cebadas.

Se utilizaron células cebadas de la línea HRMC (46) que son células cebadas que presentan un fenotipo de cc de mucosa las cuales se cultivaron en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina, hepes 1M y penicilina-estreptomicina (100X) (RPMI-SFB) durante 24 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

Extracción de RNA.

Se realizó el aislamiento del RNA a partir de 1.5×10^6 células. Las células se homogenizaron con 1.5 mL de trizol y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 300 μ L de cloroformo al 100% y la suspensión se agitó vigorosamente durante 2 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a temperatura ambiente a 12000 x g a 4 °C. La fase acuosa se recuperó y se mezcló suavemente con 1 volumen de

isopropanol frío al 100%. Las muestras se incubaron durante 2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para precipitar el RNA, pasado este tiempo se centrifugaron a $12000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Finalmente los tubos se decantaron para eliminar los residuos de isopropanol de la pastilla de RNA y se lavó con 1 mL de etanol al 75% preparado con H₂O-DEPEC al 0.01%, inmediatamente se centrifugó a $12000 \times g$ durante 15 minutos. El sobrenadante se eliminó y una vez seca la pastilla de RNA se resuspendió en 150 μL de H₂O-DEPEC al 0.01% estéril. A la mezcla se le añadieron 0.2 μL de inhibidores de RNAsas y se depositaron en un tubo eppendorf de 500 μL , manteniéndola a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

RT-PCR.

Para la retro-transcripción, se utilizó la enzima M-MLV Reverse Transcriptase, Gibco, midiendo en un tubo eppendorf de 0.5 mL, 10 μL de RNA, 1 μL de hexanucleótidos, 1 μL de dNTP's, 4 μL de 5x First buffer, 2 μL de DTT, 0.2 L de inhibidor de RNAsas y 1 μL de enzima M-MLV RT, bajo las siguientes condiciones: $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 52 minutos, posteriormente se incubaron a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos y después a congelación para un volumen final de 25 μL .

Para la PCR se utilizó la enzima Platinum Taq DNA Polymerase. Invitrogene. En un tubo eppendorf de 0.5 mL se midieron 5 μL de Buffer PCR 10x, 1 μL de dNTP's, 1 μL de primers sentido y antisentido, 0.4 μL de enzima Platinum Taq Polymerase 5 U/ μL , 15 μL de cDNA, 1.5 μL de magnesio y 26.1 μL de agua para un volumen final de 50 μL . Las condiciones fueron: 94°C por 5 minutos, posteriormente 35 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto seguida de una extensión final de $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Las secuencias de los iniciadores empleados son:

5'-ACCAAGTGCCACAAAGGAACC-3' y 5'-TACACACGGTGTCTGTTTCTCC-3', los cuales codifican para el dominio extracelular de TNFR1. Los tamaños de los productos de la PCR esperados son de 322 pares de bases, los cuales fueron separados electroforéticamente sobre geles de agarosa al 2 % y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

Para las amplificaciones se emplearon las enzimas: M-MLV Reverse Transcriptase Gibco, RT AMV; Taq Plus Long. PCR System. Stratagene. Takara Shuzo Co., Ltd, Under California, U.S.; Platinum Pfx DNA Polymerase. Invitrogene Corporation, under California, U.S.A.; Promega Taq DNA Polymerase. Madison, WI U.S.A. 1996-1998; Taq DNA Polymerase. Roche Molecular Biochemicals. Mannheim Germany. 2001; Platinum Taq DNA Polymerase. Invitrogene life technologies. Brasil.

Purificación.

El cDNA obtenido de la RT-PCR se purificó empleando el kit QIAquick Spin Handbook. QIAGEN, 2000. De acuerdo al tamaño del gel se adicionaron 3 volúmenes de buffer QG por un volumen de gel (100mg-100uL) en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se incubó la mezcla anterior a 50 °C durante 10 minutos hasta diluir el gel, agitando con un vortex durante 2 minutos. Posteriormente se adicionó un volumen de isopropanol proporcional al gel y se mezcló, pasándose la mezcla a través de una columna de QIAquick, coleccionándose 2 mL de sobrenadante. Inmediatamente se centrifugó la columna a 8000 rpm durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Para lavar la columna, se adicionaron 750 µL de buffer PE a la columna QIAquick y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm. Después para eluir el DNA atrapado en la membrana de sílica de la columna se adicionó 50 µL

de H₂O y se dejó a reposar durante 5 minutos para después centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. El cDNA se colecta en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se guarda a 4 °C. El anterior se utiliza para la secuenciación genómica, realizando primeramente una cuantificación del cDNA.

Cuantificación.

Se realizó una curva tipo de cuantificación del cDNA del TNFR1 con el kit: Molecular Probes. Pico Green dsDNA. Quantitation, empleando una dilución de 1:200, con la siguiente curva:

Curva Tipo

Medias

UF (Unidades Fluorescencia)	Nanogramos (ng/mL)
Blanco	0.723
20	2.19
60	6.185
100	11.45
150	20.49
400	51.265
800	103.95
1000	135.35

Coeficiente de correlación de 0.99 como valor mínimo

Dilución inicial de la muestra de TNFR1 fue de 1:20

Lectura de TNFR1: 30.13 U de fluorescencia

Concentración de TNFR1: 234.169.

$234.169 \times 20(\text{dilución}) = 4683.38$ **(4.683ng/UI)**

PCR de secuenciación.

Se realizó una PCR de secuenciación con el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction adicionando 6.41 μL del DNA cuantificado del TNFR1, 8.39 μL de agua, 3 μL de Big die terminator, 3.2 μL del oligo TNFR1 reverse y forward a una concentración de 1 pmol/ μL con un volumen final de 20 μL ; bajo las siguientes condiciones: 25 ciclos de: 96° C durante 10 segundos, 50° C por 5 segundos, 60° C durante 4 minutos y finalmente a 4° C.

Secuenciación.

Posteriormente se purificó la muestra obtenida de la PCR de secuenciación con las columnas Dye Ex 2.0 Spin Kit de QIAGEN for dye-terminator removal, pesándose 20 μL a una columna Dye Ex 2.0 previamente agitada y centrifugada para eliminar el gel a 3000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente de colocar la muestra en el centro de la columna se centrifugó la columna a 3000 rpm durante 2 minutos. Después el sobrenadante se secó en una centrifugadora Speed Vac, obteniéndose una pastilla seca de cDNA. Enseguida se desnaturalizó la pastilla de cDNA con 10 mL de formamida calentándose en baño María a ebullición durante 5 minutos. Después se montó la muestra en un gel de poliacrilamida en un secuenciador ABI PRISM Sistem. ABI 100, modelo 377.

RESULTADOS.

Del RNA obtenido de las células HRMC se realizó la retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el cDNA, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 300 pb (figura 4) correspondiente al RNAm del TNFR1. Este fragmento fue amplificado con la enzima Platinum Taq DNA Polymerase.

Para obtener el producto observado en la figura 4 se realizaron amplificaciones con las enzimas mencionadas en la metodología para RT-PCR, obteniéndose diversos fragmentos amplificados que no correspondieron al RNAm del TNFR1 (imagen electroforética no mostrada), a continuación se indica el tamaño correspondiente de estos fragmentos para cada enzima:

Taq Plus Long. PCR System. Stratagene, USA: 280 pb

Platinum Pfx DNA Polymerase. Invitrogene, USA: 250, 550 y 800 pb

Taq DNA Polymerase. Promega, USA: 250 pb

El producto de 300pb se secuenció (figura 5), observándose una región genómica de 297 pares de bases, en donde cada pico corresponde para una base, de acuerdo al color presentado. La secuencia observada corresponde para el anti-sentido del RNAm del TNFR1, al compararlo con la secuencia librería genómica de las células C6 de glioma de rata.

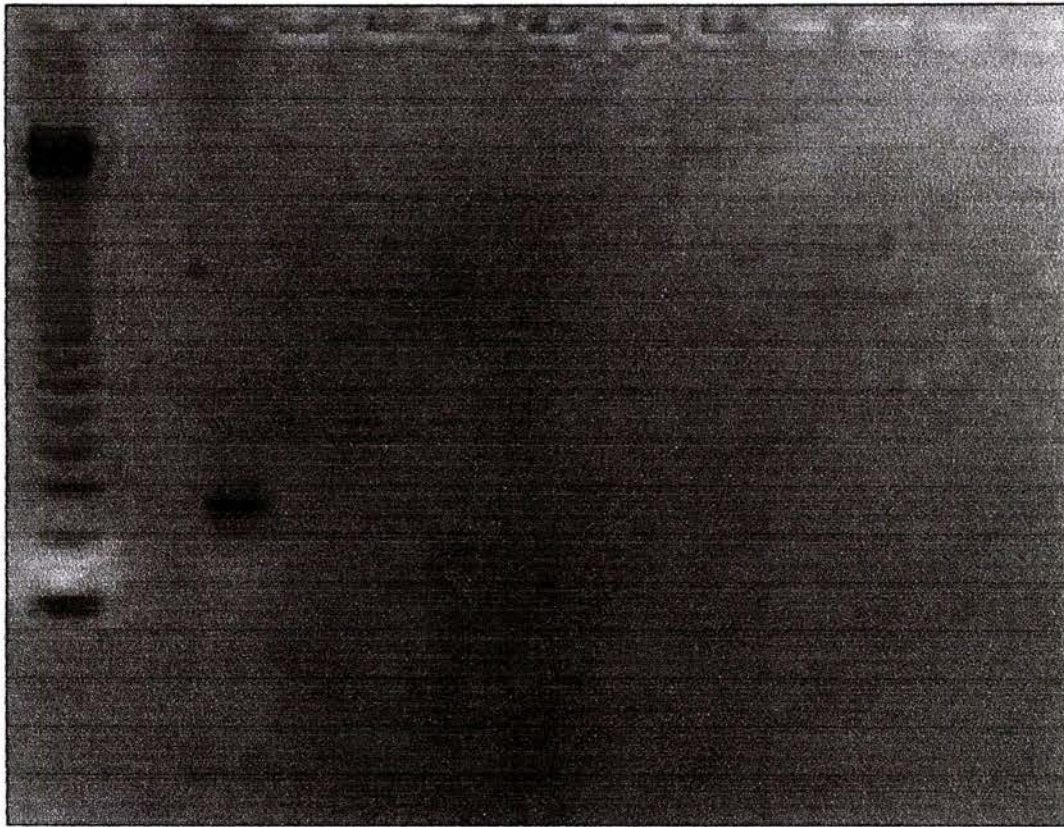


Figura 4. Electroforesis del cDNA del TNFR1 en células cebadas en donde se observa en el primer carril los marcadores de 123 pares de bases, en el tercer carril se observa un fragmento amplificado de alrededor de 300 pares de bases en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

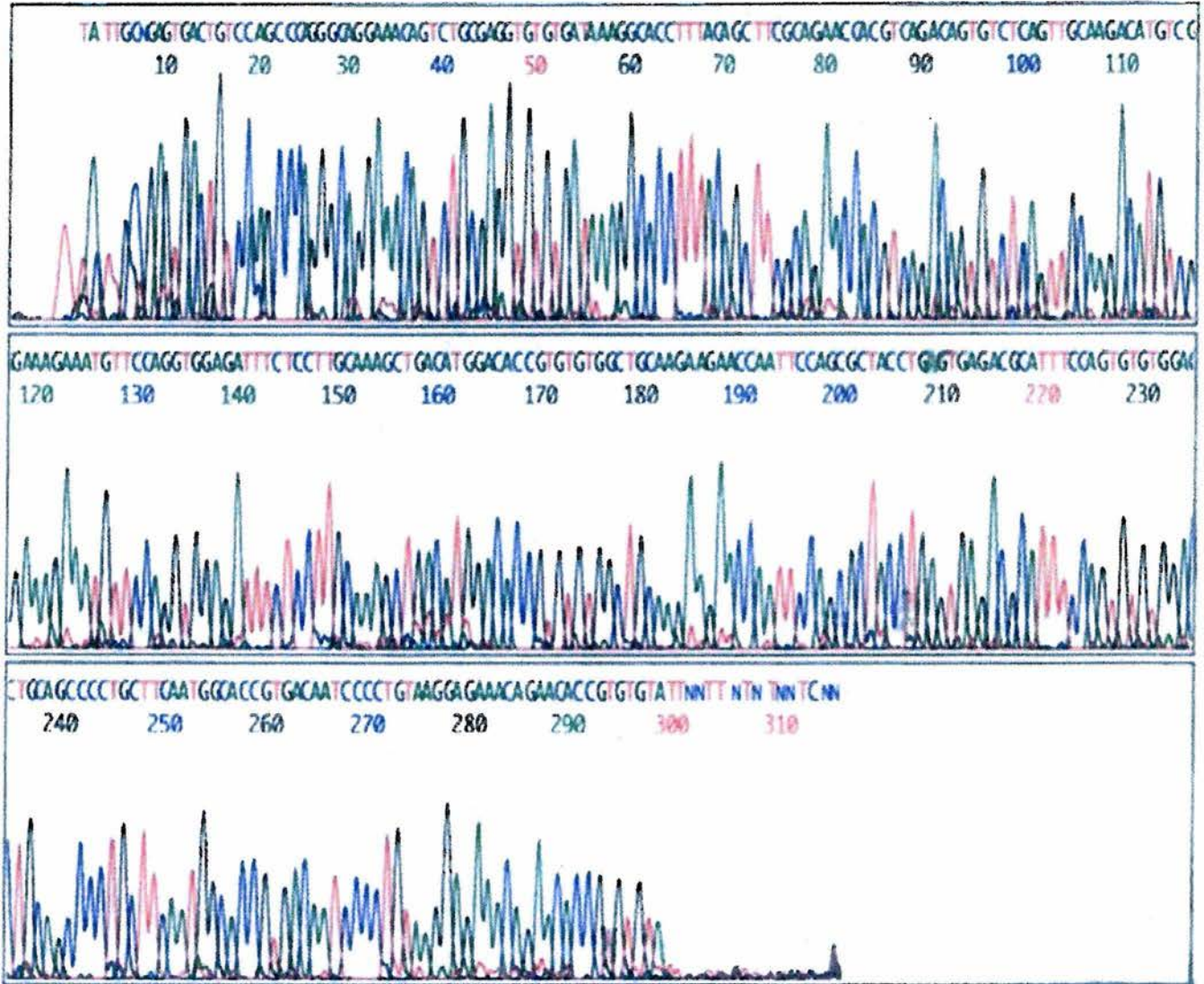


Figura 5. Análisis de secuenciación genómica. Electroferograma de la secuenciación genómica del RNAm del receptor 1 para el factor de necrosis tumoral alfa en células cebadas de la línea HRMC, en donde se observa un fragmento amplificado de cerca de 297 pares de bases correspondiente al TNFR1, realizada en un secuenciador 377ABI Sistem.

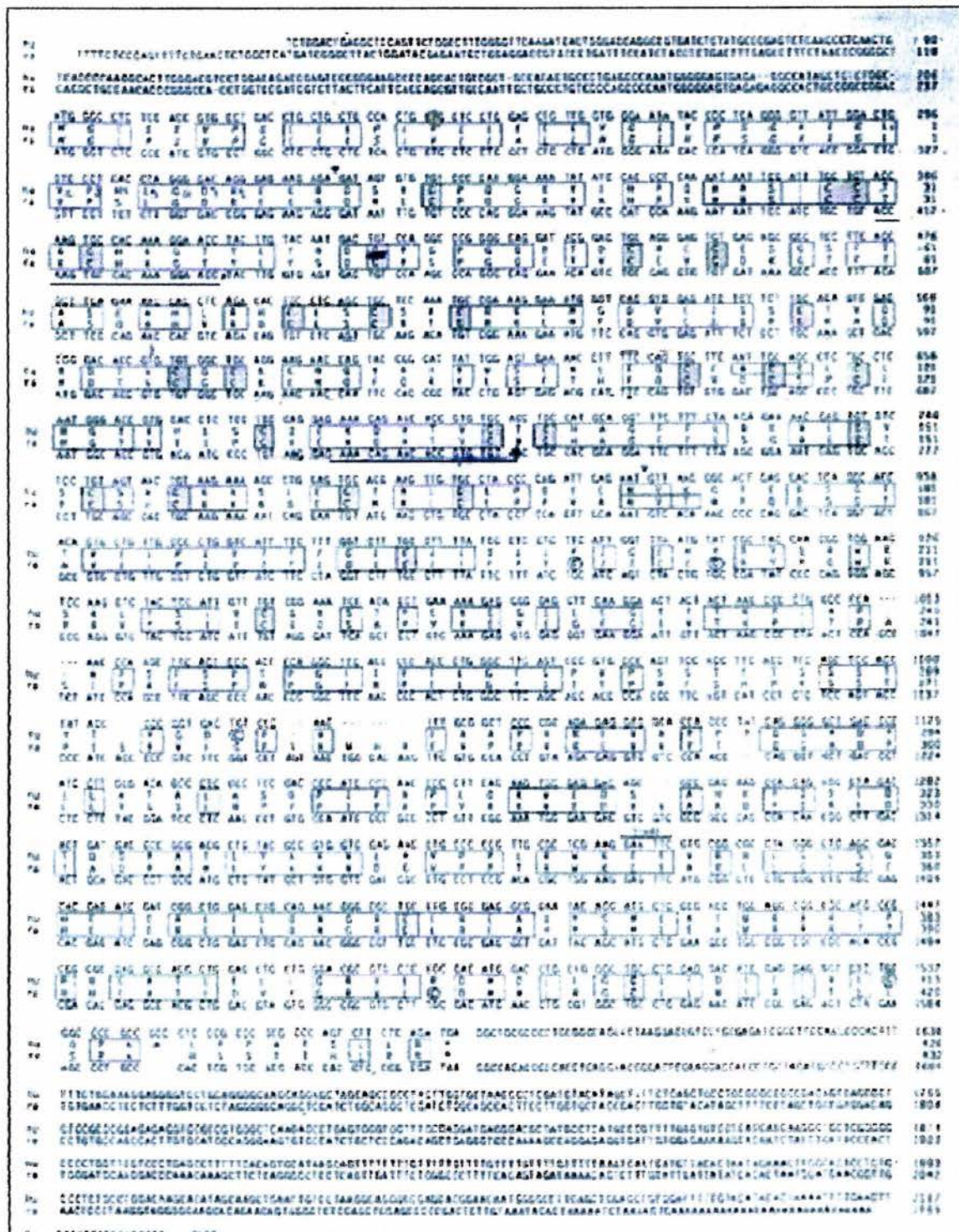


Figura 6. Secuencias genómicas del receptor para el factor de necrosis tumoral en humano y células C6 de glioma de rata (7) Los secuencias de bases subrayadas corresponden a los primers empleados como sentido y antisentido para secuenciar el RNAm del TNFR1 en células cebadas HRMC.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En este estudio se obtuvo un fragmento genómico correspondiente para el RNAm del receptor 1 para el factor de necrosis tumoral alfa en células cebadas de la línea HRMC, con un tamaño de 297 pares de bases indicados en la figura 5.

La amplificación de cDNA obtenido de la retro-transcripción fue complicada, debido a la obtención de fragmentos con tamaño diferente al esperado, lo que revela un accidentado proceso de estandarización de la PCR para obtener el fragmento de 322 pares de bases, definido por los primers sense y antisense.

Los primers utilizados fueron calculados de acuerdo a la librería genómica del TNFR1 en las C6 de glioma de rata, en donde se pudo observar que la secuencia genómica obtenida del producto amplificado de las células HRMC tienen un 100% de homología con las células C6 de glioma de rata.

La presencia del TNFR1 en las células HRMC es de gran importancia debido a que las células cebadas producen y almenan TNF alfa en sus gránulos **(6)**, la cual es liberada al medio extracelular ante un estímulo como la presencia de la toxina A de *Clostridium difficile*, presentándose la formación de cuerpos apoptóticos en células cebadas **(5)** lo que puede vislumbrar un nuevo mecanismo de regulación celular mediante la unión del TNF alfa a su receptor TNFR1 por los que tales células pueden participar en la respuesta inmune inicial frente a un estímulo extracelular.

La unión de TNF alfa, liberado por algunos tipos celulares como las células cebadas, a sus receptores de superficie células, TNFR1 y TNFR2, pueden desencadenar diferentes señales entre las cuales destacan los estímulos para citotoxicidad e inducción de genes, proliferación de fibroblastos, resistencia a la clamidia y síntesis de prostaglandina E2, mientras que el TNFR2 señala para la proliferación de timocitos primarios y líneas de células T citotóxicas

(37)

CONCLUSIONES.

Debido a que aunque se presume en la literatura, que las células cebadas pueden presentar receptores para el TNF en su superficie esto no ha sido demostrado. Así, la importancia de este trabajo radica en que se ha demostrado mediante estudios moleculares que las células cebadas de la línea HRMC presentan RNAm del receptor 1 para el factor de necrosis tumoral alfa (TNFR1). La secuenciación del RNAm del TNFR1 apoyará estudios posteriores para seguir caracterizando a este receptor en las células cebadas, el cual podría ser modulado por el mismo TNF liberado por las células cebadas como un mecanismo autócrino.

REFERENCIAS.

1. Coward WR, Okayama Y, Sagara H, Wilson SJ, Holgate ST, and Church MK. NF- κ B and TNF- α : A Positive Autocrine Loop in Human Lung Mast Cells? *J. Immunol.* 2002; **169**: 5287-5293.
2. Gurish MF, Austen KF. The Diverse Roles of Mast Cells. *J. Exp. Med.* 2001; **194** (1): F1-F5.
3. Grell M, Zimmerman G, Gottfried E, Chun-Ming C, Grunwald V. Induction of cell death by tumor necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *European Molecular Biology Organization Journal.* 1999; **18** (11): 3034-3043.
4. Galli SJ, Maurer M and Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Current Opinion in Immunology.* 1999; **11**: 53-59.
5. Calderón GM, Torres J-Lopez, Lin T-J, Chavez B, Hernández M, Muñoz O, Befus DA, and Enciso JA. Effects of Toxin A from *Clostridium difficile* on Mast cell Activation and Survival. *Infection and Immunity.* 1998; **66** (6): 2755-2761.
6. Pelletier C, Varin-Blank N, Rivera J, Iamnascoli B, Marchand F, David B, Weyer A and Blank U. Fc ϵ RI- Mediated Induction of TNF- α Gene Expression in the RBL-2H3 Mast Cell Line: Regulation by a Novel NF- κ B Like Nuclear Binding Complex. *The Journal of Immunology.* 1998; **161**: 4768-4776.
7. Himmeler A, Maurer I-Fogy, Kronke M, Scheurich P, Pfizenmaier K, Lantz M, Olsson I, Hauptmann R, Stratowa C, and Gunther RA.

Molecular Cloning and Expression of human and Rat Tumor Necrosis Factor Receptor Chain (p60 α and its Soluble Derivate, Tumor Necrosis Factor-Binding Protein. *DNA and Cell Biology*.1990; **9**: 705-715.

8. Lung HL, Leung KN, Stadlin A, Ma CM, Tsang D. Induction of tumor necrosis factor receptor type 2 gene expression by tumor necrosis factor- α in rat primary astrocytes. *Elsevier Science*.2001; **68**: 2081-2091.

9. Mizuno T, Goto Y, Baba K, Masuda K, Ohno K and Tsujimoto H. 2002. Molecular cloning of feline tumour necrosis factor receptor type 1 (TNFR 1) and expresión of TNFR 1 and TNFR 2 in lymphoid cells in cat. *European Journal of Immunogenetics*. 2003; **30**: 107-113 .

10. Galli, S. J. New insights into "The Riddle of the Mast Cells:" Microenvironmental regulation of mast cells development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990; **62**: 5-33.

11. Echtenacher, B., Mannel, D. N., and Hultner, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996; **381**: 75-77.

12. Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S. N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature* 1996; **381**: 77-80.

13. Malaviya R, E A Ross, J I MacGregor, T Ikeda, J R Little, B A Jakschik and S N Abraham. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol* 1994; **52**: 1907-1914.

14. Abraham SN and Malaviya R. Mast cells in infection and Immunity. *Infection and Immunity*. 1997; **65**: 3501-3508.

15. Lucaks NW, Strieter RM, Chensue SW, and Kunkel SL. Activation and regulation of chemokines in allergic airway inflammation. *J. Leucocyte Biol*. 1996; **59**: 13-17.

16. Metzger H. The high affinity receptors for IgE on mast cells. *Clin Exp. Allergy*. 1991; **21**: 269-279.

17. Katz HR, Raizman MB, Gartner CS, Scott HC, Benson AC, and Austen KF. Secretory granule mediator release and generation of oxidative metabolites of arachidonic acid via Fc-IgG receptor bridging in mouse mast cells. *J Immunol*. 1992; **148**: 868-871.

18. Malaviya R, Ross EA, Mac Gregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, and Abraham SN. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J. Immunol*. 1994; **152** (4): 1907-1914.

19. Kirshenbaum A. S., Kessler S. W. Goff J. P. Metcalfe, D. D. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34⁺ bone marrow progenitor cells. *J Immunol*. 1991;**146**:1410-1415.

20. Arock M., Hervatin F., Guillosson J. J., Mencia-Huerta J. M., and Thierry, D. Differentiation of human mast cells from bone-marrow and cord-blood progenitor cells by factors produced by a mouse stromal cell line. *Ann N Y Acad Sci*. 1994; **725**: 59-68.

- 21.** Fodinger, M., Fritsch G., Winkler K., Emminger, W. Millerbauer, G. Gadner, H. Valent, P., and Mannhalter, C. Origin of human mast cell development from transplanted hematopoietic stem cells after allo-eneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1994; **84**: 2954-2959.
- 22.** Kirshenbaum A. S., Goff, J. P., Kessler, S. W., Mican, J. M., Zsebo, K. M., Metcalfe, D. D. Effects of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34 pluripotent progenitor cells. *Journal of Immunology*. 1992; 148: 772-777.
- 23.** Rodewald, HR, Dessing, M., Dvorak, A. M., and Galli, S. J. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science*. 1996; **271**: 818-822.
- 24.** Agis, H., Willheim, M., Sperr, W. R., Wilfing, A., Kromer, E., Kabma, E., Spanblochl, E., Strobl, H., Geissler, K., Spittler, A., Boltz-Nitulescu, G., Majdic, O., Lechner, K., and Valent, P. Monocytes do not make mast cells when cultured in the presence of SCF. Characterization of the circulating mast cell progenitor as a c-kit⁺, CD34⁺, Ly-⁻, CD 1 4⁻, CD 1 7⁻, colony-forming cell. *J Immunol*. 1993; **151**: 4221-4227.
- 25.** Fredric F ger, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN and Arock M. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *TRENDS in immunology*. 2002; **23**: 151-157.
- 26.** Mousli M, T E Hugli, Y Landry and C Bronner. Peptidergic pathway in human skin and rat peritoneal mast cell activation. *Immunopharmacology*. 1994; **27**:1-11.

- 27.** Swieter M, Chan BMC, Rimmer C, Mc Neill K, Froese A, and Befus D. Isolation and characterization of IgE receptors from rat intestinal mucosal mast cells. *Eur. J. immunol.* 1989; **19**: 1879-1885.
- 28.** Befus AD. Mast Cell Heterogeneity and Functions in Mucosal Defenses and Pathogenesis. *Essentials of Mucosal Immunology.* Academic Press. 1995; **25**: 341-354.
- 29.** Kaplan AP, reddigari S, Baeza M, and Kuna P. Histamine releasing factors and citokine-depend activation of basophils and mast cells. *Adv. Immunol.* 1991; **50**: 237-254.
- 30.** Abe T, Swieter M, Imai T, denHollander N, and Befus AD. Mast cell heterogeneity: Two-dimensinonal gel electrophoretic analysis of rat peritoneal and intestinal mucosal mast cells. *Eur. J. Immunol.* 1990; **20**: 1941-1947.
- 31.** Gordon JR, and Galli SJ. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alfa (TNF-alfa)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the FcεRI: a mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alfa during IgE-dependent biological responses. *J. Exp. Med.* 1991; **174**: 103-107.
- 32.** Hyun-Ja J, Seung-Hean H, Dong-Jin L, Jae-Hwang P, Kyung-Suk K. Hyung-Min K. Role of Ca²⁺ on TNF-alpha and IL-6 secretion from RBL-2H3 mast cells. *Elsiever Science.* 2002; **14**: 633-639.
- 33.** Tartaglia LA, Pennica D, and Goeddel DV. Ligand Passing: The 75-kDa Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor Recruits TNF for Signaling by The 55 k-Da TNF Receptor. *The Journal of Biological Chemistry.* 1993; **268**(25): 18542-18548.

- 34.** Bader T and Nettesheim P. Tumor Necrosis Factor-alpha Modulates the Expression of Its p60 Receptor and Several Cytokines in Rat Tracheal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*. 1996; 157: 3089-3096.
- 35.** Baker SJ and Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*. 1998; **17**: 3261-3270.
- 36.** Lee E-K, Khrlı Jr ME, Taylor MJ. Cloning and sequencing of cDNA encoding bovine tumor necrosis factor (TNF)-receptor I. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1998; 61: 379-385.
- 37.** Strasser A, O`Connor L, and Dixit VM. Apoptosis Signaling. *Annu., Rev Biochem*. 2000; **69**: 217-245.
- 38.** Hoofman HP, Remy R, Brockhaus M, van Loon APGM. Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha). *Journal of Biological Chemistry*. 2000; **264**: 14927-14934.
- 39.** Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Stem cells*. 1999; 17: 306-313.
- 40.** Loetscher H, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, and Lesslauer W. Molecular cloning and expression of the human 55-Kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1990; **61**: 351-359.
- 41.** Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, and Goodwin RG. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science*. 1990; **258**: 1019-1023.

- 42.** Tartaglia LA and Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunology Today*. 1992; **13** (5): 151-153.
- 43.** Bryan C. Bamhart and Marcus E. Peter. The TNF Receptor 1: A Split Personality Complex. *Cell*. 2003;**114**:2:148-150.
- 44.** Ashkenazi A and Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*. 1998; 281: 1305-1362.
- 45.** Brito GAC, Fujii J, A Carneiro-Filho, Lima AAM, Obrig T, and Guerrant RL. Mechanism of *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Apoptosis in T84 Cells. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002; 186: 1438-1447.
- 46.** Zheng Y, B M C Chan, E S Rector, I Berczi and A Froese. Establishment and characterization of hybrid rat mast cells. *Experimental Cell Research*. 1991; 194: 301-309.