



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA TROMBINA SOBRE CÉLULAS CEBADAS DE
ORIGEN MURINO. ESTUDIO MOLECULAR SOBRE UNA
ESTIMULACIÓN NO ANTIGENICA CAPAZ DE INDUCIR
DESGRANULACIÓN Y SÍNTESIS DE CITOCINAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

AURELIO HERNÁNDEZ MÉNDEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTOR(A): DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA

2007



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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
"Efecto de la trombina sobre células cebadas de origen murino. Estudio molecular sobre una
estimulación no antigénica capaz de inducir desgranulación y síntesis de citocinas".

realizado por Aurelio Hernández Méndez

con número de cuenta 09721311-2 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a) Dra. Claudia González Espinosa.
Propietario

Propietario Dr. Jesús Adolfo García Sáinz.

Propietario Dra. Rocío Salceda Sacanelles.

Suplente Dra. Marina Macías Silva.

Suplente Dra. María Eugenia Torres Márquez.

[Handwritten signatures: Claudia González Espinosa, Jesús Adolfo García Sáinz, Rocío Salceda Sacanelles, Marina Macías Silva, María Eugenia Torres Márquez]

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 20 de febrero
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGÍA

del 2007

[Handwritten signature of Dr. Zenón Cano Santana]

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Esta tesis fue realizada en el departamento de Farmacobiología de la sede sur del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Durante el tiempo en el que se desarrollo esta tesis, se cubrieron los créditos correspondientes al taller de titulación “Transducción de señales/Mecanismo de acción de mensajeros químicos extracelulares”, impartido en la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Dedicatoria.

A mis padres, Cecilia y Pedro.

A mis hermanas, Sandra y Lulú.

Agradecimientos:

A la Dra. Claudia González Espinosa por todo lo que aprendí a su lado en el laboratorio.

A Maria Eugenia Cid por la paciencia y tiempo que dedico para mi entrenamiento.

Al Dr. Jesús Adolfo García Sainz, a la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, la Dra. Marina Macias Silva y a la Dra. Maria Eugenia Torres Márquez por sus valiosos comentarios y aportaciones a la presente tesis.

Al señor Armando Resendis por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A Jaciel, Juan Pablo, Martín, Gabriela, Marta, Roberto, Elizabet y Jaime por la ayuda y amistad brindada a lo largo de mi estancia en el Laboratorio 11 de la sede sur del CINVESTAV.

Este proyecto de investigación pudo realizarse gracias al apoyo económico de la Academia de Ciencias del Tercer Mundo (donativo No. 02-073) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (donativo CONACYT-2002-C01-39726), para la compra de materiales y equipo.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	6
II. INTRODUCCIÓN.....	7
II. 1. Células cebadas.....	9
II. 2. Mediadores.....	10
II. 3. FcεRI.....	13
II. 4. Trombina.....	15
II. 5. Receptores acoplados a proteínas G.....	15
II. 6. Receptores activados por proteasas (PARs).....	16
II. 7. Acción de la trombina en células cebadas.....	19
II. 8. Cinasas de las familias de Syk y Src.....	20
II. 9. Organismos knockout.....	22
III. HIPOTESIS.....	23
IV. OBJETIVOS.....	24
V. MATERIAL Y METODOS.....	25
V. 1. Reactivos.....	25
V. 2. Cultivo de células cebadas derivadas de medula ósea (BMDC).....	25
V. 3. Liberación de β-hexosaminidasa (desgranulación).....	26
V. 4. Incubación con inhibidores.....	27
V. 5. Extracción de RNA.....	27
V. 6. Ensayo de protección contra RNasa I (RPA).....	28

VI. RESULTADOS.....	31
VI. 1. Las BMMCs pueden ser activadas antigénicamente.....	31
VI. 2. La trombina induce desgranulación de las BMMCs.....	32
VI. 3. Un agonista PAR-1 induce desgranulación de las BMMCs pero no así un agonista PAR-2.....	33
VI. 4. Syk participa en la desgranulación inducida por trombina.....	35
VI. 5. TR induce la expresión de citocinas y quimiocinas.....	36
VI. 6. Participación de cinasas de la familia de Src en la señalización por trombina en BMMCs.....	39
VI. 7. Participación de Fyn en la desgranulación inducida por trombina.....	40
VII. DISCUSION.....	42
VIII. CONCLUSIONES.....	49
IX. ANEXO.....	50
ABREVIATURAS.....	52
X. BIBLIGRAFIA.....	53

I. RESUMEN

La trombina (TR), una proteasa importante en la coagulación sanguínea, es capaz de inducir desgranulación y síntesis de citocinas en células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC). Esto lo hace por medio de receptores en la membrana celular, conocidos como PARs, que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Se han identificado cuatro de estos receptores: PAR-1, 3 y 4 activados por trombina y PAR-2 activado por triptasa. La trombina lleva a cabo un corte proteolítico en el extremo amino terminal del receptor, exponiendo un nuevo extremo amino terminal el cual funge como ligando para el receptor (“ligando atado”). En este trabajo se determinó el subtipo de PAR que induce la desgranulación en BMMCs, además de la posible participación en esta vía de activación de cinasas importantes en el sistema de transducción del receptor FcεRI. Para identificar el subtipo de receptor involucrado en la respuesta a TR por parte de las BMMCs se usaron dos péptidos, uno selectivo para PAR-1 (TRAP-6) y otro para PAR-2 (PAR2-AP), teniendo como resultado una respuesta dependiente de la dosis con TRAP-6 y una nula respuesta con el péptido PAR2-AP. El pretratamiento de las BMMCs con inhibidores selectivos para la cinasa Syk y las cinasas de la familia de Src (Piceatannol y PP2 respectivamente), antes de recibir un estímulo de DNP/HSA (antígeno), TR y TRAP-6, inhibió la desgranulación de una manera dependiente de la concentración. Piceatannol indujo una inhibición de la desgranulación en células activadas con los tres estímulos; la inhibición de Syk alteró la síntesis de citocinas y quimiocinas en células activadas con TR y TRAP-6 así como en las BMMCs activadas con DNP/HSA. PP2 a una concentración de 10μM inhibió la desgranulación completamente en las células estimuladas con DNP y la respuesta a TR disminuyó de 100 a 41.64 ± 6.71 % con 10μM de PP2; mientras que la actividad secretora de las BMMCs en respuesta a TRAP-6 se redujo a 69.96 ± 3.63 % a la misma concentración de PP2. Para determinar el papel de la cinasa Fyn se utilizaron células carentes de esta cinasa (Fyn^{-/-}) las cuales fueron tratadas con DNP, TR y TRAP-6, encontrándose una disminución en la desgranulación de estas células con respecto a las células tipo silvestre (WT). Estos resultados indican que la desgranulación mediada por TR es vía el receptor PAR-1 y que en la cascada de señalización inducida por TR participan las cinasas de tirosina Syk y Fyn como en la vía del receptor FcεRI, sin embargo la síntesis del mRNA de algunas citocinas en respuesta a trombina no parece estar mediada por Syk.

II. INTRODUCCION.

Las células cebadas (MC, del inglés Mast Cells), se han estudiado principalmente por su papel en la hipersensibilidad inmediata que es mediada por anticuerpos. Los efectos en los individuos atópicos como extravasación vascular, broncoconstricción, hipermotilidad intestinal e inflamación son el resultado de la acción de mediadores que se encuentran en los gránulos de las células cebadas, y que son vertidos al medio extracelular por exocitosis en un evento llamado desgranulación, además de la síntesis *de novo* de mediadores lipídicos y citocinas.

En la hipersensibilidad inmediata, la inmunoglobulina E (IgE) es la principal responsable de la desgranulación por parte de las MC; los organismos conocidos como atópicos generan una cantidad mayor de la normal de IgE, tras el contacto con una proteína o sustancia del ambiente llamada alérgeno; niveles altos de IgE predisponen a las células cebadas a responder tras un nuevo contacto con el alérgeno ocasionando una respuesta que puede llegar a ser mortal, como el choque anafiláctico (anafilaxia significa que los anticuerpos pueden producir lo opuesto a la protección o profilaxis, Abbas, et al. 2002).

Estas células no solo juegan un papel deletéreo en organismos atópicos, sino que tienen importantes papeles en la defensa contra patógenos, la inflamación y reparación tisular. Las MC como todas las células se ajustan a las circunstancias y responden a las necesidades de cada momento. Esto es posible gracias a una gran gama de mediadores secretados por estas células que se encuentran almacenados en sus gránulos (citocinas, quimiocinas, aminas biogénicas y proteasas), estos mediadores son secretados al medio extracelular y difunden por el torrente sanguíneo, afectando a células que se encuentran en lugares lejanos al sitio de secreción; es como si las células cebadas se comunicaran y ejercieran su acción por “control remoto” (Fig. 1B).

Además de la IgE y el alérgeno o antígeno existen otros mecanismos de activación de las MC; por ejemplo la enzima trombina (TR), la cual juega un papel crucial en la coagulación sanguínea; esta enzima es capaz de activar a las MC por medio de la familia de receptores conocidos como receptores activados por proteasas (PAR), receptores que a su vez pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas

G. Un corte proteolítico en el extremo amino terminal llevado a cabo por la trombina expone un nuevo extremo amino terminal, el cual funciona como ligando y activa al receptor trayendo consigo una cascada de señalización que culmina con la desgranulación de las MC.

En la actualidad las rutas de señalización que regulan la activación de las MC se están estudiando ampliamente y resulta evidente que la respuesta secretora de estas células es característica del estímulo particular de activación (Galli, 2005). En este trabajo se aborda el problema de encontrar el subtipo de receptor PAR que induce la desgranulación de las células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC, del inglés bone marrow-derived mast cells) y se evalúa el papel de distintas proteínas con actividad de cinasa de tirosina (Syk y cinasas de la familia de Src, específicamente Fyn) en la vía de transducción de señales activada por trombina en ese modelo celular. Además se analiza la posible participación de estas cinasas en la síntesis del mRNA de citocinas y quimiocinas promovida por TR.

II. 1. CELULAS CEBADAS

Las células cebadas forman parte del tejido conectivo, tienen de 20 a 30 μm de diámetro, son ovoides y presentan un núcleo esférico en la parte central. La característica de identificación de las células cebadas es la presencia de muchos gránulos en el citoplasma (Fig. 1A), esta característica instó a Paul Ehrlich en 1879 a llamarlas “Mastzellen” que hace alusión a que las células están llenas de comida, pues se pensaba que los gránulos eran resultado de una gran actividad fagocítica llevada a cabo por estas células (Wilhelm, et al., 1978); los gránulos varían en tamaño de 0.3 a 0.8 μm . y debido a que estos gránulos contienen heparina (o sulfato de condroitina), y se tiñen de forma metacromática con azul de toluidina. El citoplasma no tiene características especiales e incluye varias mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y un complejo de Golgi relativamente pequeño (Gartner y Hiatt, 2002).

Anteriormente se confundía a las células cebadas con los basófilos por sus propiedades fenotípicas y funcionales, pero en realidad estas células difieren en su contenido de mediadores y funciones. Ambos tipos celulares se originan de células madre

pluripotenciales $CD34^+$ residentes en la médula ósea, y mientras que los basófilos maduran en la médula ósea y pasan a la circulación, los precursores de las células

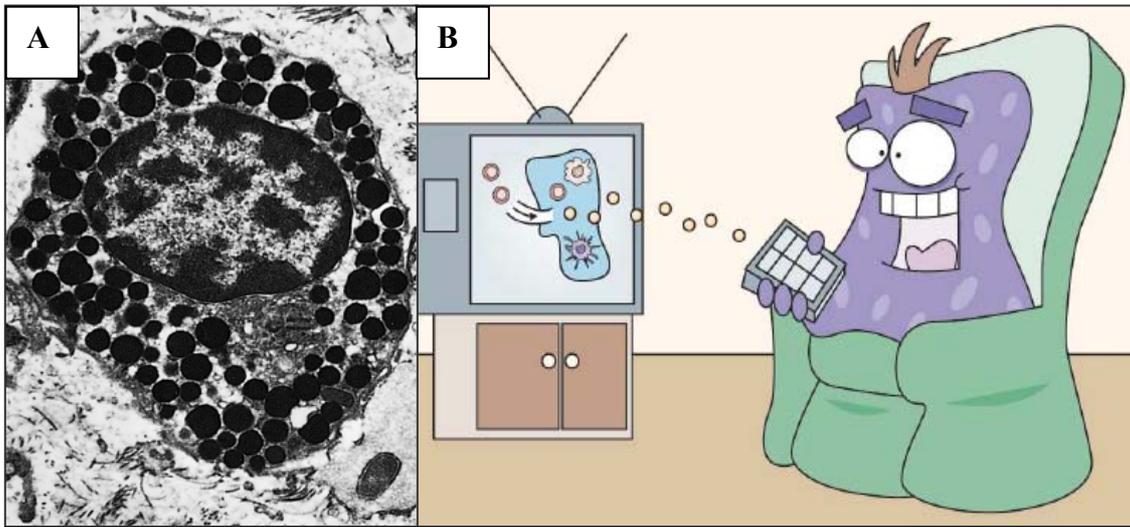


Fig. 1. A) Microfotografía de una célula cebada de rata. Se pueden observar en su interior gran cantidad de gránulos (tomado de Gartner y Hiatt, 2002). B) Las células cebadas ejercen su acción por “control remoto”. Los mediadores dentro de sus gránulos pueden ser secretados al medio extracelular y difundir por el torrente sanguíneo afectando a células que se encuentran en lugares lejanos al sitio de secreción. (Buckland, 2003).

cebadas migran desde la medula ósea hasta el tejido conectivo de las superficies mucosales y epiteliales donde terminan de diferenciarse (González, 2003). Las MCs residen normalmente cerca del epitelio, vasos sanguíneos, nervios, en las vías aéreas, la cavidad peritoneal y el tracto digestivo (Wilhelm, et al., 1978). Las células cebadas y los basófilos pueden producir un espectro similar pero no idéntico de mediadores proinflamatorios, además de ciertas citocinas y quimiocinas (Galli, et al., 2005). Ambas están consideradas como células efectoras claves en las reacciones de hipersensibilidad y desórdenes alérgicos asociados a la IgE (Galli, et al., 2005).

Las MCs expresan un arreglo de inmunoreceptores y otros receptores de superficie que les permiten responder a muy diferentes estímulos, como son el factor de células madre (SCF), la interleucina-3 (IL-3), el lipopolisacárido (LPS), ciertos productos de activación del complemento y muchos neuropéptidos; y además participar en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos (Castells, 1997; Marshal, 2004; Galli, et al., 2005).

Tres propiedades de las MCs son importantes para la comprensión de cómo estas células complementan otros componentes efectores del sistema inmune: la primera es su habilidad para producir de manera rápida y selectiva mediadores apropiados; la segunda, su habilidad para aumentar el reclutamiento de células efectoras, debido a su situación en la proximidad de los vasos sanguíneos; y la tercera, su habilidad para modificar respuestas a infecciones subsecuentes a través de la activación dependiente de anticuerpos y efectos sobre la inmunidad adquirida (Marshall, 2004).

Las MCs exhiben una variedad de fenotipos (a lo que se le conoce como heterogeneidad de las MCs), que difieren principalmente en el contenido de mediadores y la respuesta a un estímulo particular. Esta heterogeneidad es el resultado de las condiciones del ambiente donde los precursores de las MCs terminan de desarrollarse y que se ve influido por la proximidad con otras células, presencia de citocinas e interacciones con la matriz extracelular. Así en roedores se han reconocido dos fenotipos denominados MCs de tejido conectivo, cuyo contenido de los gránulos es principalmente heparina, y MCs mucosales que se sitúan en la proximidad de las superficies mucosales y sus gránulos contienen sulfato de condroitina. En humanos las MCs se clasifican por su contenido de serina proteasas, así tenemos a las que contienen solo triptasa (MC^T) y las que tienen triptasa y quimasa (MC^{TC}), (Vliagoftis y Befus, 2005).

II. 2. MEDIADORES

Las sustancias secretadas por las MCs pueden dividirse en mediadores preformados, que incluyen a las aminas biogénicas y las macromoléculas de los gránulos; y mediadores sintetizados *de novo*, que incluyen los mediadores lipídicos y las citocinas (ver tabla 1). A continuación se describirán las principales familias de mediadores.

Aminas biogénicas: en las células cebadas del ser humano, el único mediador de esta clase presente en cantidades suficientes es la histamina, pero en ciertos roedores la serotonina puede ser de igual o incluso mayor importancia. La unión de la histamina al endotelio produce una modificación entre las uniones de las células endoteliales, lo cual favorece la salida del plasma hacia los tejidos. También estimula a estas células para

que sinteticen relajantes de la capa de músculo liso vascular, como la prostaglandina 2 (PGI₂) y óxido nítrico, que producen vasodilatación. Además la histamina produce la contracción del músculo liso bronquial e intestinal. Así la histamina puede contribuir al aumento del peristaltismo y al broncoespasmo asociados a la ingestión de alérgenos o al asma respectivamente (Abbas, et al. 2002).

Mediadores	Ejemplo de función
Asociado a gránulos	
Histamina y Serotonina	Altera la permeabilidad vascular
Heparina y/o condroitin sulfato peptidoglicanos	Aumenta la función de quimiocinas y/o citocinas y angiogénesis
Triptasa, Quimasa, Carboxipeptidasa y otras proteasas	Remodelación de tejidos y reclutamiento de células efectoras
TNF- α , VEGF y FGF2	Reclutamiento de células efectoras e incremento de la angiogénesis
Derivados lipídicos	
LTC ₄ , LTB ₄ , PGD ₂ Y PGE ₂	Reclutamiento de células efectoras, regulación de la respuesta inmune, y promueven la angiogénesis, edema, y broncoconstricción
Factor activador de plaquetas	Activa células efectoras, incrementa la angiogénesis
Citocinas	
TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, GM-CSF, LIF, INF- α e INF- β	Inducción de inflamación
IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15 e IL-16	Funciones de citocinas Th tipo 2
IL-12 e IFN- γ	Funciones de citocinas Th tipo 1
IL-10, TGF- β y VEGF	Regula inflamación y angiogénesis
Quimiocinas	
CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 y CCL20	reclutamiento de células efectoras, incluyendo células dendríticas, y regulan la respuesta inmune
CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10 y CXCL11	Reclutamiento de células efectoras y regulación de la respuesta inmune
Otros	
Oxido nítrico y radicales superóxido	Bactericida
Péptidos antimicrobianos	Bactericida

TABLA 1. Mediadores que son liberados por las células cebadas. CCL, quimiocinas CC (ligando, C=cisteína); CXCL, quimiocinas CXC (ligando, C=cisteína, X=cualquier aminoácido); FGF2, factor de crecimiento de fibroblastos 2; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos; IFN, interferón; IL, interleucina; LIF factor inhibidor de leucemia; LTB₄, leucotrieno B₄; LTC₄, leucotrieno C₄; PGD₂, prostaglandina D₂; PGE₂, prostaglandina E₂; TGF- β , factor de crecimiento transformante- β ; TNF, factor de necrosis tumoral; VEGF, factor de crecimiento de endotelio vascular. (Tomado de Marshall J. S., 2004).

Proteínas de los gránulos: las serina proteasas neutras, como la triptasa y quimasa son los componentes proteicos más abundantes de los gránulos secretores de las células cebadas. La triptasa esta presente en todas las células cebadas de humano y no se sabe si se encuentra en algún otro tipo celular. La triptasa escinde el fibrinógeno y activa la colagenasa, contribuyendo así a la lesión tisular, además de poder activar a receptores en la membrana de algunas células (por ejemplo, PAR-2); además también pueden estar presentes la carboxipeptidasa A y la catepsina G. Los proteoglicanos, como la heparina y el coindroitin sulfato, también son componentes principales de estos gránulos.

Mediadores lipídicos: los mediadores más importantes de este tipo son metabolitos del ácido araquidonico generados por acción de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa. Los mediadores derivados del ác. araquidónico por la vía de la lipooxigenasa son los leucotrienos, especialmente el leucotreno C4 (LTC4) y sus productos de degradación LTD4 y LTE4. La prostaglandina D2 (PGD2) se deriva por la accion de la ciclooxigenasa (Abbas, et al. 2002).

Citocinas: algunas de estas son TNF- α , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, CCL3, CCL4, entre otros. La activación de las células cebadas induce la trascripción y síntesis *de novo* de estas citocinas. Además de intervenir en la inflamación alérgica, las citocinas producidas por las MCs también parecen contribuir a la respuesta inmunitaria innata frente a las infecciones (Abbas, et al. 2002).

Quimiocinas: entre ellas podemos encontrar CCL-2, CCL-3, CCL-4, CXCL-9 y CXCL-11, que tienen un papel esencial en regular la producción de células inmunes, organizar su localización en tejidos especializados, controlar su reclutamiento y activación en respuesta a un estímulo inflamatorio (Pease y Williams, 2006.).

La vía de activación de las MCs mas estudiada es la desencadenada por un antígeno que entrecruza al receptor Fc ϵ RI que veremos a continuación.

II. 3. FcεRI.

En humanos y roedores, el receptor de alta afinidad para la IgE, llamado FcεRI se expresa sobre la superficie de las células cebadas y basófilos como un receptor heterotetramérico compuesto de una subunidad α que cuenta con el sitio de unión a la IgE, una subunidad β con cuatro segmentos transmembranales, y dos subunidades γ unidas entre sí por dos puentes disulfuro (Galli, et al., 2005).

La IgE que participa en las reacciones alérgicas, como el resto de las moléculas de anticuerpos, es sintetizada exclusivamente por las células B. Aunque la IgE libre tiene una vida media corta en el plasma (dos o tres días comparada con 21 días de la IgG), la IgE unida al FcεRI de la superficie de las células cebadas puede permanecer allí durante varios meses (González C., 2003). La constante de disociación (Kd) del receptor FcεRI para la IgE es de aproximadamente 1×10^{-10} M; esta unión es mucho mas fuerte que la de cualquier otro receptor Fc por su ligando. Como consecuencia, la concentración sérica de la IgE, es suficientemente alta para permitir la ocupación de los receptores FcεRI (Abbas A. K. et al. 2002).

Un antígeno que es reconocido por la IgE unida a los receptores, entrecruza a dos o mas de estos y activa así a la cinasa de tirosina Lyn que se asocia a las cadenas β y fosforila los llamados motivos de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) de la cadena β, luego hace lo mismo con los ITAMs de las cadenas γ.

Una vez fosforilados los ITAMs de las cadenas γ, a éstas se recluta Syk que es una cinasa de residuos de tirosina; la unión de Syk a los ITAM de las cadenas γ hace posible su autofosforilación y activación. Syk activada pueden fosforilar muchas proteínas adaptadoras y enzimas. Syk fosforila a LAT, que a su vez permite el reclutamiento y posterior activación de la fosfolipasa Cγ (PLCγ), (Blank y Rivera, 2004).

La PLCγ hidroliza el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI-4,5P2) a inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), que regulan el flujo de calcio y la activación de la proteína cinasa C (PKC).

La agregación del FcεRI también activa a la cinasa de tirosina Fyn, que se asocia a las cadenas β y fosforila a Gab2; esta proteína fosforilada sirve para unir la subunidad P85 de la PI3K, reclutando posteriormente a la subunidad catalítica P110 que fosforila PI,4,5-P2 y genera fosfatidilinositol 3, 4, 5, trifosfato (PI,3,4,5,P3). (Galli 2005).

Toda esta cascada de señalización trae como consecuencia la secreción de mediadores presentes en los gránulos como la β-hexosaminidasa, la histamina, las proteasas y las prostaglandinas en la llamada fase temprana de la respuesta alérgica que comprende los primeros minutos después de ocurrido el entrecruzamiento. En la llamada fase tardía son sintetizadas varias citocinas que no son componentes de los gránulos como la IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α e IFNγ (Fig. 2).

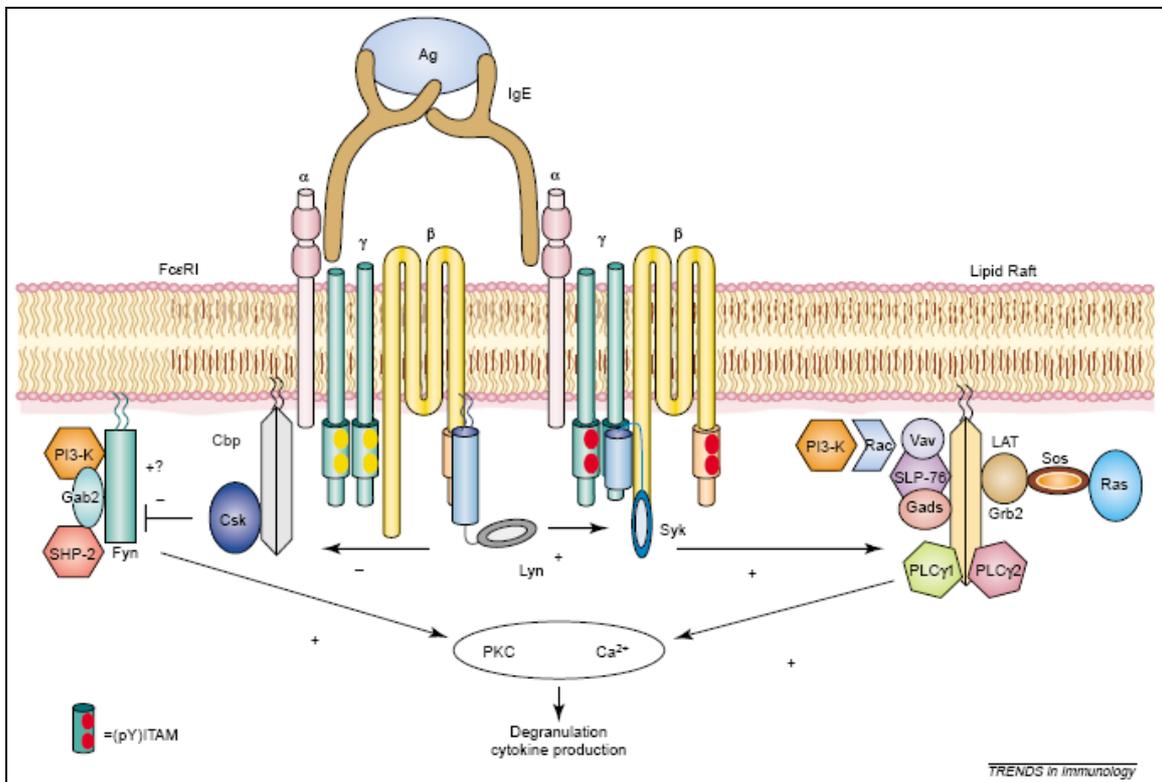


Fig. 2. Activación del receptor FcεRI. El FcεRI está compuesto de una cadena α de unión a la fracción Fc de la IgE, una cadena β con cuatro segmentos transmembranales y dos cadenas γ unidas por puentes disulfuro. El entrecruzamiento de dos o más receptores FcεRI en la membrana de las células cebadas por un antígeno, resulta en la fosforilación de los motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina (ITAM) presentes en las cadenas β y γ por la cinasa Lyn, seguida de la activación de la cinasa Syk tras la unión a los ITAM fosforilados de las cadenas γ; Syk por su parte fosforila a la proteína de andamio LAT donde se forman y activan complejos proteicos responsables de la desgranulación y síntesis de citocinas en las células cebadas. El entrecruzamiento del FcεRI también activa rápidamente a la cinasa Fyn, cuya actividad es importante para la fosforilación de una proteína adaptadora conocida como Gab-2, la cual ayuda a la activación de la PI3K que también participa en la respuesta celular (tomado de Blank y Rivera, 2004).

II. 4. TROMBINA

La trombina es una proteasa de serina que se genera a partir de su zimógeno que es la protrombina; esta protrombina es generada en el hígado y circula por el torrente sanguíneo hasta que llega a un sitio de daño vascular donde un complejo formado por el factor de coagulación Va y Xa llamado “protrombinasa” presente en la membrana celular de células endoteliales convierte a la protrombina en α -trombina (Lane, et. al, 2005).

La α -trombina posee un sitio activo conformado por los aminoácidos His, Ser y Asp; además dos centros de reconocimiento para substratos, conocidos como exosito I (también llamado sitio de unión a hirudina) y exosito II (conocido como sitio de reconocimiento de fibrinógeno) (Strukova, 2001).

Aparte de la α -trombina existen otras isoformas de esta enzima, como la β y γ -trombinas que resultan de la degradación proteolítica de la α -trombina por tripsina (Rydel, et. al, 1994), en este trabajo haremos referencia solo a la α -trombina la cual llamaremos simplemente trombina.

La Trombina desempeña actividades biológicas importantes en los procesos de hemostasis y cicatrización que van desde la coagulación, en la que participa catalizando la hidrólisis del fibrinógeno a fibrina y la activación de las plaquetas, hasta la estimulación de las respuestas celulares implicadas en los procesos de inflamación y de reparación de los tejidos dañados (Gartner y Hiatt, 2002); esto lo hace a través de la activación de una familia de receptores llamados receptores activados por proteasas (PAR, del inglés Proteinase Activated Receptors). Los PAR pertenecen a una amplia familia de receptores que es la llamada superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés).

II. 5. Receptores acoplados a proteínas G.

Los receptores acoplados a proteínas G son también conocidos como receptores de serpiente o de siete dominios transmembranales porque poseen siete hélices α que

atraviesan la membrana, unidas por asas extra e intracelulares alternadas. Estos receptores son proteínas formadas por aproximadamente 450 aminoácidos con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular; el extremo carboxilo contiene secuencias que corresponden a sitios consenso de fosforilación por proteínas cinasas y que están involucrados en eventos de desensibilización (Lodish et al., 2003).

Los GPCRs son activados por una gran variedad de ligandos como neurotransmisores peptídicos y no peptídicos, citocinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas odorantes y luz. La unión de un ligando con uno de estos receptores induce un cambio conformacional, haciendo que la proteína G heterotrimérica (conformada por una subunidad α , una β y una γ) intercambie guanosina difosfato (GDP) que esta unido a la subunidad α por una molécula de guanosina trifosfato (GTP), haciendo que se disocie la subunidad α de las subunidades $\beta\gamma$, permitiendo la activación de diversos efectores río abajo de la vía de señalización (Hamm, 1998).

Existen varias clases de proteínas G heterotrimericas, las cuales se han agrupado de acuerdo a su subunidad α en cuatro familias: $G_{s\alpha}$, que estimula a la adenilato ciclasa; $G_{i/o\alpha}$, que inhibe a la adenilato ciclasa; $G_{q/11\alpha}$, que activa isoformas de la fosfolipasa $C\beta$ (PLC β) y $G_{12/13\alpha}$, que estimula a RhoGEF. Además de esto el dímero formado por las subunidades β y γ ($G_{\beta/\gamma}$) también puede estimular distintos efectores (Mirisen y Guditkind, 2001; Milligan y Kostenis, 2006)

II. 6. Receptores activados por proteasas (PARs).

Los PARs son activados por proteínas capaces de hacer un corte proteolítico (proteasas). Existen cuatro tipos de receptores PAR (PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4), PAR-1, 3 y 4 pueden ser activados por Trombina, PAR-2 es activado por Tripsina o Triptasa.

El modelo prototípico de activación de un PAR es el de PAR-1, el cual es activado cuando el exosito I de la TR se une a una secuencia de aminoácido que es parecida a hirudina situado en el extremo amino terminal entre los residuos 51-63 del receptor (Vu, et al., 1991), además de llevarse a cabo otra unión entre el exosito II y el extremo

amino del receptor; así se produce una división proteolítica en la secuencia LDPR↓SFLR (↓, división) entre los aminoácidos Arg41-Ser42 situados en el extremo amino terminal que se encuentra en el medio extracelular, generándose un nuevo extremo amino terminal que desempeña la función de “ligando atado” (Fig. 3). Este ligando atado consiste en una secuencia de 5 aminoácidos (SFLLR en humanos, ver tabla 2), que se unen a la segunda asa extracelular del receptor induciendo con esto un cambio conformacional que permite la activación de una proteína G la cual transduce la señal e inicia la cascada de señalización.

PAR-3 y PAR-4 también son activados por TR por una división proteolítica en sus extremos amino terminal (Ishihara, et al, 1997; Xu, et al., 1998); PAR-3 posee la secuencia de unión al exosito I de TR pero PAR-4 no, por lo que para una respuesta de PAR-4 se requieren concentraciones mas altas de TR (de 10 a 100 veces) y se ha propuesto que PAR-3 podría estar actuando como cofactor para la activación de PAR-4, esto en células transfectadas con ambos receptores donde se ve una mayor respuesta que en las células transfectadas con uno solo de estos receptores (Nakanishi-Matsui, et al., 2000).

PAR-1 puede acoplarse a miembros de las familias de G12/13, Gq y Gi, teniendo por lo tanto una multitud de efectores intracelulares (Coughlin, 2000).

Para el estudio de estos receptores se han sintetizado una serie de penta y hexapéptidos basados en las secuencias de aminoácidos de los ligandos atados de los distintos receptores, estos péptidos sintéticos son conocidos como PAR-APs (péptidos activadores de los receptores PAR) o TRAPs (péptidos activadores de receptores de trombina), y lo que hacen es mimetizar la unión del ligando propio del receptor induciendo su respuesta sin necesidad de un corte proteolítico. Sin embargo se desconoce por que el receptor PAR-3 no responde a los PAR-APs basados en su secuencia de ligando atado, lo que ha dificultado su estudio (Ishihara, et al., 1997).

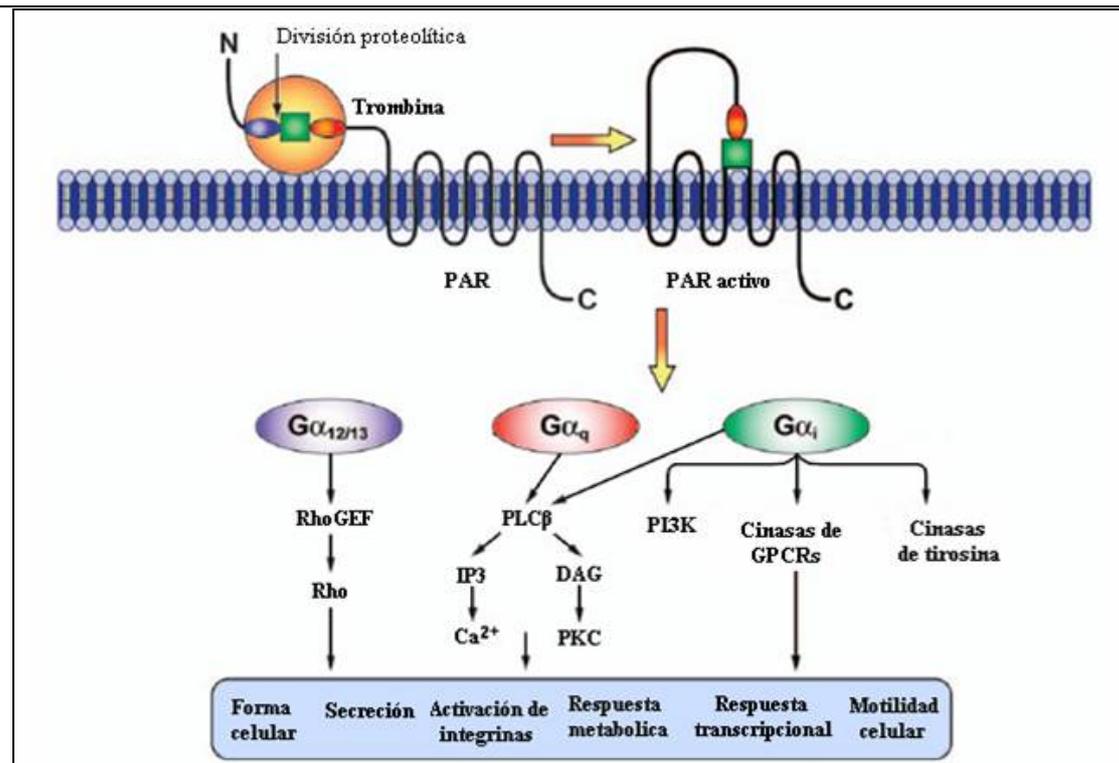


Fig. 3. Mecanismo de activación de PAR-1. La trombina reconoce e interactúa con el extremo amino terminal del receptor PAR-1; la secuencia parecida a hidruina (ovalo rojo en el receptor) interactúa con el exosito I de la TR y la secuencia parecida a fibrinógeno (ovalo azul) se une al exosito II. Esta interacción trae como consecuencia la división proteolítica del extremo amino terminal del receptor entre los residuos Arg 41 y Ser 42; la división revela un nuevo extremo amino terminal el cual funciona como ligando del receptor (cuadrado verde, “ligando atado”) y se une a la segunda asa extracelular del receptor para activarlo. Se han identificado en varios modelos celulares la participación de tres subtipos de proteínas G acoplados a estos receptores como $G_{\alpha 12/13}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha i}$; las cuales desencadenan una gran variedad de cascadas de señalización que tienen consecuencias importantes en las células como: secreción, respuesta transcripcional, entre otras, dependiendo el tipo celular que se trate. (Coughlin S. R., 2000).

Las cascadas de señalización de proteínas G acopladas a los PAR activados incrementan la actividad de la fosfolipasa C y los niveles de Ca^{2+} intracelular, además la activación de proteínas G también genera respuestas transcripcionales a través de cinasas que regulan las señales extracelulares, las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK) y el factor nuclear κB . Los efectos del incremento de Ca^{2+} intracelular incluyen secreción, desgranulación y contracción del músculo liso y regula la transcripción de genes de integrinas, quimiocinas y citocinas. (Reed, y Kita, 2004). El acoplamiento a proteínas G específicas probablemente varía entre diferentes PARs y diferentes células.

RECEPTOR:	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
COMPOSICIÓN DE AMINOACIDOS	425 aa. (h)	397 aa. (h)	374 aa. (h)	385 aa. (h)
SECUENCIA DE LIGANDO ATADO	SFLLR (h) SFLLR (m, r)	SLIGKV (h) SLIGRL (m, r)	TFRGAP (h) SFNGGP (m)	GYPGQV (h) GYPGKV (m)
PEPTIDOS AGONISTAS SELECTIVOS	TFLLR-NH2 TFRIFD SFLLRN	SLIGKV-NH2 (h) SLIGRL-NH2 (m, r)		GYPGKV-NH2 GYPGQV-NH2 AYPGKF-NH2
LIGANDOS DE ALTA AFINIDAD	Trombina	Tripsina, Triptasa.	Trombina	Trombina

Tabla 2. Ligandos de los receptores PARs. Los péptidos agonistas de los PARs están basados en las secuencias de ligando atado de los propios receptores. (aa.) aminoácidos, (h) humano, (m) ratón, (r) rata. (Datos tomados de Steinhoff, et al., 2005).

II. 7. Acción de la trombina en células cebadas.

Se ha estudiado la acción de la TR en distintas poblaciones de células cebadas; por ejemplo, la TR puede activar a las BMDCs de forma rápida (1-2 min) induciendo la liberación de β -hexosaminidasa a una concentración de 0.5 U/ml (Razin y Marx, 1984). Esto también sucede en MCs aisladas del peritoneo de ratas (RPMC), además de provocar la liberación de histamina (Dugina, et al., 2003).

También se ha detectado la secreción de IL-6 inducida por TR, la cual es capaz de aumentar la liberación de IL-6 inducida por antígeno (Gordon, et al., 2000). En RPMCs se ha detectado por RT-PCR la presencia de los receptores PAR-1 y PAR-2 (Nishikawa, et al., 2000; Stenton, et al., 2002), distintos péptidos selectivos para ambos receptores e inclusive tripsina (enzima capaz de activar a PAR-2) se han probado en RPMCs, a los cuales las células han respondido de una mejor manera a lo hecho por TR (Alic, et al., 2001; Stenton, et al., 2002; Nishikawa, et al., 2000; Dugina, et al. 2003.). Otra de las cosas que se han detectado es la adhesión a fibronectina después de la activación de

BMMCs por TR y la liberación de MMP-9 (metaloproteasa de matriz-9) y la activación de las MAP-quinasas (Vliagoftis, 2002).

Resultados en el laboratorio indican que las BMMCs expresan los 4 tipos de receptores PAR, PAR-1 y 2 en mayor cantidad que PAR-3 y 4 (González-Espinosa, datos no publicados); estas células responden a la trombina liberando β -Hexosaminidasa en cantidades cercanas al 20% del total de la enzima contenida en las células y además puede inducir la síntesis de las mismas citocinas que induce la activación por antígeno, solo que en una proporción menor, aproximadamente una tercera parte (González-Espinosa C. et al., 2003). Además también se ha visto que la respuesta a TR se inhibe totalmente con la toxina pertusis (PTX) y que TR induce la activación de las MAPK y la PI3K (González-Espinosa, datos no publicados).

II. 8. Cinasas de las familias de Syk y Src.

Las cinasas de tirosina citoplasmáticas de la familia Src, así como la tirosin cinasa Syk se han implicado en una variedad de vías de señalización, por ejemplo la señalización del receptor para células B (BCR), la vía de señalización de las integrinas y la vía de señalización de los receptores para la fracción Fc de los anticuerpos (FcR).

La familia de Syk está integrada por Syk y ZAP-70 y se caracteriza por la presencia de un par de dominios 2 de homología a Src (SH2) en la región amino terminal, además de su sitio catalítico (Fig. 4). Se ha visto que Syk es importante para el desarrollo de células B, además de participar en el desarrollo de los mamíferos, pues ratones carentes de esta cinasa (Syk^{-/-}) no sobreviven mas de 2 días después del nacimiento (Turner, et al., 1995).

Syk tiene distintos sustratos, como SLP-76, LAT, α y γ tubulinas en la desgranulación de las células cebadas mediada por el Fc ϵ RI (Siraganian, et al., 2001).

Las cinasas de la familia Src conformada por ocho miembros (Src, Fgr, Fyn, Yes, Blk, Hck, Lck y Lyn) cuya característica es poseer un dominio 3 de homología a Src (SH3), y un dominio SH2 aparte del dominio de cinasa (Fig. 4), se ha implicado en eventos de

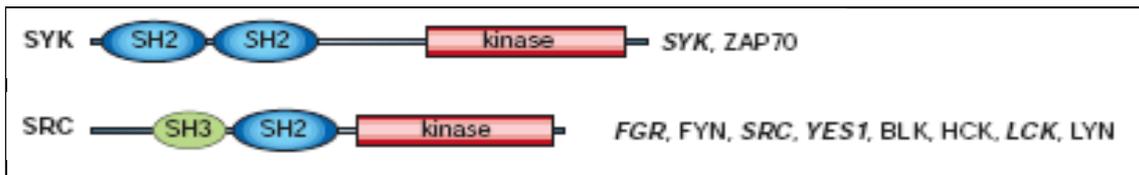


Fig. 4. Cinasas de tirosina no receptores de las familias de Syk y Src. La familia de Syk posee un par de dominios 2 de homología a Src (SH2) en la región amino terminal que son capaces de unirse a residuos de tirosina fosforilados y un dominio de cinasa (sitio catalítico). La familia de Src posee un dominio 3 de homología a Src (SH3), que le permite unirse a sitios ricos en prolina en otras proteínas, un dominio SH2 y su dominio de cinasa (tomado de Blume-Jensen y Hunter, 2001).

señalización mediados por señales mitogénicas de muchos receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs) y en una variedad de tipos de cáncer (Blume-Jensen y Hunter, 2001).

Los dominios SH2 les permiten a las proteínas acoplarse a fosfotirosinas, mientras que los dominios SH3 les sirven para unirse a sitios ricos en el aminoácido prolina. Lyn y Fyn dos cinasas de esta familia tienen importante participación en la desgranulación inducida por antígeno y sus principales sustratos son los ITAMs de las cadenas β y γ del receptor, además de que Fyn puede fosforilar a Gab-2.

Existe controversia sobre la participación de Syk en la señalización de GPCRs, Mócsai, et al. (2003) descartan la participación de Syk en la fosforilación de las MAPK de células cebadas carentes de la cinasa Syk que fueron activadas con adenosina. De igual manera se descarta a Syk en la activación de las MAPK y la liberación de ácido araquidónico en MCs de la línea celular RBL-2H3 estimuladas con carbacol que activa al GPCR muscarínico m1, Syk no parece estar actuando (Hirasawa, et al., 1995). Sin embargo otros datos muestran la participación de Syk en la activación del receptor muscarínico a acetilcolina m1 en la activación de las MAPK en la línea celular de linfoma aviar DT40; su fosforilación en células hepáticas JTC-27 en respuesta a angiotensina II y también su fosforilación de forma rápida en la activación de plaquetas por TR, son otros ejemplos que sugieren alguna participación (Wan, et al., 1997; Tsuchida, et al., 2000; Taniguchi, et al., 1993).

En lo que respecta a las cinasas de la familia de Src, se ha reportado una rápida estimulación de Fyn y Src en la vía del receptor de TR en fibroblastos (Chen, et al., 1994). Otro ejemplo de activación de cinasas de la familia de Src en vías de señalización que tienen que ver con los GPCRs es la vía del receptor para IL-8 conocido como CXCR1 donde se ha propuesto la participación de Hck junto con la β -arrestina en un complejo que estaría mediando el tráfico y liberación de gránulos de leucocitos neutrofilicos polimorfonucleares, sin embargo la forma en que esta se da no es clara (Barlic J., et al., 2000).

II. 9.Organismos “knockout”

La generación de organismos multicelulares transgénicos ha ayudado a comprender la función de distintos genes en los seres vivos, así se han desarrollado organismos que presentan genes de otros organismos, lo que les puede dar cierta ventaja al presentar alguna característica favorable. Otro tipo de organismo son a los que se les ha bloqueado la expresión de un gen particular, con el objeto de observar cambios en el desarrollo y la fisiología de los organismos, los cuales son el resultado de la ausencia del gen bloqueado (“knockout”).

Los ratones han emergido como un modelo experimental en mamífero excelente para el estudio de genes implicados en enfermedades humanas. El procedimiento para hacer ratones “knockout” se basa en el uso de células madre embrionarias pluripotenciales, a las cuales se les ha microinyectado el DNA de un gen mutado. El objetivo de esta técnica es obtener células en que el DNA inyectado se inserte en el sitio del cromosoma donde se encuentra el gen que se quiere modificar, para anularlo. La pequeña fracción de células con la inserción en el sitio correcto, se puede seleccionar usando genes marcadores específicos que faciliten su seguimiento y selección (Pardo y Selman, 2002). En este trabajo, como se verá mas adelante, se utilizaron células provenientes de ratones carentes de la cinasa de tirosina Fyn ($Fyn^{-/-}$), los cuales son completamente viables y fértiles, aunque presentan defectos en la señalización del receptor de células T, fallas en el flujo de calcio en respuesta a la activación de este receptor, así como una reducción en los niveles de proteínas fosforiladas en tirosinas (http://jaxmice.jax.org/strain/002271_3.html).

III. HIPOTESIS

La trombina inducirá la desgranulación y la síntesis de citocinas en las células cebadas mediante la activación directa o indirecta de receptores PAR (PAR-1 y PAR-2), y el mecanismo de transducción de tales receptores utilizará algunas cinasas comunes del sistema de transducción del FcεRI.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es dilucidar los mecanismos bioquímicos de activación de las células cebadas derivadas de médula ósea inducidos por trombina. En tanto que los objetivos particulares son los siguientes:

- Caracterizar las respuestas de desgranulación inducidas por trombina.
- Determinar el subtipo de receptor involucrado en la respuesta de las células cebadas a la trombina.
- Caracterizar el papel de las cinasa Syk en la desgranulación inducida por trombina.
- Analizar la inducción de distintos genes de citocinas en células cebadas estimuladas con trombina y la participación de Syk en esta.
- Determinar el papel de las cinasas de la familia de Src en la respuesta inducida por trombina.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

V. 1. Reactivos

Se usaron los siguientes reactivos: IgE-anti DNP monoclonal (D8404, SIGMA), DNP/SHA (dinitrofenil-seroalbumina humana de SIGMA, A-6661), α -Trombina de plasma de bovino (SIGMA, T-4265), TRAP-6 (peptido selectivo para PAR-1 cuya secuencia de aminoácidos es SFLLRN de SIGMA-ALDRICH, T.1573), PAR2-AP (peptido selectivo para PAR-2 cuya secuencia de aminoácidos es SLIGRL de SIGMA-ALDRICH, S.9317), Piceatannol (3,3',4,5'-Tetrahydroxy-Trans-stilbene, de SIGMA-ALDRICH, P0453), PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidine, de SIGMA), un Kit de transcripción *In Vitro* para RPA (BD RiboQuant, Cat. No. 556850), Kit de RPA (BD RiboQuant, Cat. No. 556134) y UTP [α -33P] (NEG/307H, Perkin Elmer). La TR y los péptidos se disolvieron en agua para almacenarlos en alícuota, mientras que piceatannol y PP2 se disolvieron en DMSO al 100% para su almacenamiento.

V. 2. Cultivo de células cebadas derivadas de medula ósea (BMMC).

Se sacrificaron ratones tipo silvestre (WT) de la cepa 129S1/SvImJ (JAX® Mice) de 6 a 8 semanas de edad en una cámara con atmósfera saturada de éter; con ayuda de material quirúrgico estéril se separaron las extremidades posteriores de los animales y se pusieron en cajas de plástico estériles. En una campana de flujo laminar se separaron las tibias y se cortaron los extremos, se inyectaron 2 ml. de medio RPMI (ver en el anexo) en el centro del hueso con una jeringa de 0.5 mm, para expulsar la médula ósea, misma que se recogió en una caja de petri estéril. Se agregaron 30 ml de medio RPMI y se dejó el cultivo en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C por cuatro semanas para la proliferación y diferenciación de las células en BMMC mucosales.

Se siguió el mismo procedimiento para inducir la diferenciación de medula ósea de ratones knockout de la cinasa Fyn (Fyn^{-/-}), de la cepa 129-Fyn^{tm1Sor}/J (JAX® Mice).

V. 3. Liberación de β -hexosaminidasa (desgranulación)

Se contaron las BMMCs de los cultivos para tomar el número adecuado de células para este ensayo (2×10^6 células para cada tratamiento). Las células se centrifugaron a 5000 rpm. durante 5 min., se tiro el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en el volumen adecuado de buffer Tyrodes/BSA (ver anexo) para quedar a una concentración de 2×10^6 células/ml. En tubos con tapa de rosca de 1.5 ml se colocaron diferentes concentraciones ya sea de Trombina, TRAP-6 o DNP, después se agregó 1ml de las células resuspendidas en Tyrodes/BSA y se incubaron durante una hora a 37°C ; transcurrido el tiempo de estimulación los tubos se centrifugaron durante 5 min. a 14000 rpm a 4°C ; después los tubos se pusieron en hielo y se separaron los sobrenadantes por decantación.

Para determinar la β -hexosaminidasa liberada se tomaron 60 μl de sobrenadante de cada tubo y se incubaron junto con 30 μl de PNAG (P-nitrofenil N-Acetil- β -glucosamida, sustrato para la β -hexosaminidasa, ver anexo) en una placa de 96 pozos para ELISA durante 1 hora a 37°C ; pasado el tiempo de incubación se adicionó 120 μl de NaCO_3 0.1M para detener la reacción y se midió la absorbancia a una densidad óptica de 405 nm en un lector de ELISA. Se uso como control un tubo con células que no fueron estimuladas del cual se separó totalmente el sobrenadante (liberación basal) y la pastilla de células se resuspendió con Tritón al 0.5%, así se obtuvo el 100 % de β -hexosaminidasa que luego nos sirvió para calcular el porcentaje de desgranulación en las células estimuladas. Para calcular el % de liberación de β -hexosaminidasa se usó la siguiente formula:

$$\% \beta\text{-hex. liberada} = ((S-B) \times 100) / P$$

Donde S es la lectura del espectrofotómetro que da el sobrenadante de las células estimuladas, B es la lectura de la liberación basal y P la lectura de la pastilla de células sin estimular resuspendidas con Tritón.

Para las células estimuladas con DNP/SHA (dinitrofenol/sero-albúmina humana) se siguió el mismo método, pero antes de recibir el estímulo fueron incubadas con IgE anti-DNP a una concentración de 300 ng./millón de células por 1 hr. a 37°C , para

conseguir el 100% de ocupación de los receptores FcεRI. Dado que las moléculas de DNP son muy pequeñas para poder entrecruzar a los receptores ocupados por la IgE específica, varias de estas se encuentran unidas a moléculas de albúmina; de esta forma se facilita el entrecruzamiento de los receptores.

V. 4. Incubación con inhibidores.

Para inhibir la actividad de la cinasa de tirosina Syk se preincubaron las BMMCs (2×10^6 células en 1 ml de tyrode's) por 15 minutos con diferentes concentraciones de piceatannol que es un inhibidor selectivo para Syk (6.125, 12.25, 25, 50, 75 y 100 μ M), antes de ser estimuladas con DNP (9 ng/ml), trombina (1 U/ml) y TRAP-6 (27 μ M); para posteriormente medir la cantidad de β -hexosaminidasa liberada.

En otro experimento se usaron 0, 10 y 100 μ M de piceatannol para inhibir la desgranulación en células activadas con DNP (9ng/ml), TR (1U/ml) y TRAP-6(27 μ M); las pastillas de células de este experimento se guardaron a -70°C para aislar posteriormente el RNA y ver la expresión de mRNA de distintas citocinas por ensayo de protección contra RNasa (RPA).

Se utilizó PP2 para inhibir la actividad de las cinasas de tirosina pertenecientes a la familia de Src. 2 millones de células se preincubaron con PP2 a concentraciones de 1, 5, 10 o 30 μ M por 15 min, a 37°C antes de ser estimuladas con DNP (9ng/ml), TR (1U/ml) y TRAP-6 (27 μ M). Después se determinó el porcentaje de desgranulación.

V. 5. Extracción de RNA.

Las pastillas de las células estimuladas con DNP, TR y TRAP-6 en presencia de piceatannol fueron homogeneizadas en 0.5 ml de TRI-Reagent (SIGMA, T9424) por pipeteo en tubos de tapón de rosca de 1.5 ml, después a cada tubo se les adicionó 100 μ l de cloroformo y se mezcló con ayuda de un vortex, se dejaron separar las fases a temperatura ambiente por 15 min. y se centrifugó a 4°C a una velocidad de 14,000 rpm por 15 min. La fase acuosa que se formó en la parte superior de los tubos se transfirió a

nuevos tubos de tapa de rosca limpios y a los cuales se adiciono 3 μ l de glucógeno (0.2 ng/ml), se mezcló con vortex y se adicionaron 500 μ l de isopropanol, después se mezcló y dejó precipitar a temperatura ambiente por 10 min., luego se centrifugó a 4°C a 14,000 rpm durante 10 min y se separó el sobrenadante totalmente; la pastilla se lavó con 1 ml de etanol/agua DEPC al 75% frío, después se centrifugó a 14,000 rpm 10 min. a 4°C; se retiró el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente; una vez seco se resuspendió en 15 μ l de RNASecure (Ambion) por incubación a 60°C por 10 min.

Para saber la concentración de RNA se midió la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro; se usaron 2 μ l de RNA aislado, aforando a 100 μ l con H₂O DEPC.

Las muestras se guardaron a -70°C para su uso posterior en ensayos de RPA.

V. 6. Ensayo de protección contra RNAsa I (RPA).

Síntesis de las sondas.

Se utilizó un kit siguiendo las instrucciones del fabricante: se dejaron el UTP, el conjunto de nucleótidos GACU, el DTT, Buffer de transcripción 5X, y el templado para RPA (cDNA de quimiocinas o citocinas) que estaban congelados a temperatura ambiente por 10 min. Para la síntesis de la sonda, se agregó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml en el siguiente orden: 1 μ l RNAsin, 1 μ l GACU, 2 μ l DTT, 4 μ l Buffer de transcripción 5X, 1 μ l del templado para RPA, 5 μ l UTP [³³P] (50-100 μ Ci), 5 μ l H₂O DEPC, 1 μ l T7 RNA polimerasa. Se Mezcló todo por pipeteo suave y se centrifugó, luego se incubó en un baño a 37°C por 1 h. Para detener la reacción de síntesis se añadieron 2 μ l de DNAsa, se mezcló por golpeteo suave y se centrifugó, se incubó a 37°C por 30 min.; a los 25 minutos, se preparó una microcolumna G-50, de la siguiente forma: se resuspendió la resina de la columna por vortexeo, se quito la tapa y se desprendió la base de cierre de la columna, después se colocó la columna en un tubo con tapa de rosca de 1.5 ml para soporte y se centrifugó la columna por 1 min. a 3000 rpm a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 500ml de agua estéril, y se centrifugo nuevamente 1 min. a 3000 rpm para descartar el Buffer en la columna; se mantuvo la columna a temperatura ambiente.

A la reacción de DNAsa se le agregaron 26 μ l de EDTA (20mM) estéril y 2 μ l de tRNA de levadura. Se colocó la microcolumna en un nuevo tubo de 1.5 ml y suavemente se aplicó la muestra en el centro de la resina y se centrifugo a 3000 rpm por dos min. La muestra (sonda) purificada se colectó en el tubo de soporte. Después se puso a secar durante 40 min. en una centrifuga al vacío y se resuspendió la pastilla en la cantidad apropiada de Buffer de hibridación (3 μ l para cada tratamiento).

En tubos de tapa de rosca se pusieron 5 μ l de RNA aislado y se le adicionaron 10 μ l de buffer de hibridación, se mezcló y se centrifugó; luego se adicionaron 3 μ l de la sonda a los tubos con el RNA aislado de las BMMCs estimuladas. La hibridación se llevo a cabo en un baño a 50°C toda la noche.

Tratamiento con RNAsa.

Las muestras que se quedaron hibridando la noche anterior se centrifugaron por 10 s para recuperar el volumen original. Siguiendo las instrucciones del kit, se agregaron a las muestras 100 μ l de cóctel de RNAsa (1 μ l RNAsa I + T1 mix) y se incubaron 60 min. a 37°C, después de este tiempo se agregaron 18 μ l de cóctel de proteinasa K (12 μ l de buffer de proteinasa K, 1.5 μ l de proteinasa K, 1.5 μ l de tRNA de levadura y 3 μ l RNAsa secure reagent por tubo), se mezcló con vortex, se centrifugo e incubo durante 15 min. a 37°C. Luego se pusieron en cada tubo 133 μ l de una mezcla de 1 μ l de Glyco-blue con 132 μ l de acetato de amonio 4M por tubo, se mezcló y se adicionaron 650 μ l de etanol frío, se mezclaron por inversión y se incubaron por 10 min. en hielo seco, después se centrifugaron 15 min. a 14,000 rpm a 4°C. Con cuidado se removieron los sobrenadantes y se dejaron secar al aire libre. Después se resuspendieron las pastillas en 5 μ l de buffer de carga 1X por incubación de las muestras 2 min. en un baño a 90°C. Terminado el tiempo se transfirió a hielo antes de cargar el gel de poliacrilamida (ver anexo). El gel se corrió en una cámara de electroforesis (modelo S2, GIBCO BRL) a 2500 V, 300 mA y 50 Watts durante 2 horas en TBE 1X (anexo), luego el gel se transfirió a papel filtro y se puso a secar durante 2 horas en una secadora (Termo Savant, modelo SGD2000), posteriormente el gel seco se puso a exponer junto con una placa de autoradiografía (KODAK BioMax XAR Film, cat. 165 1512) dentro de un casete para autorradiografía (KODAK Bio Max) a -70°C de 3 a 7 días, para por último revelar la placa.

Métodos estadísticos. Para comprobar si la desgranulación presentada por las células $Fyn^{-/-}$ ante los distintos estímulos (DNP, TR y TRAP-6) es estadísticamente significativa con respecto a la respuesta presentada por las células WT, se realizó una prueba t de Student con una $P < 0.05$. Los experimentos presentan una $n = 3$; se muestran las medias y SEM.

VI. RESULTADOS.

VI. 1. Las BMBCs pueden ser activadas antigénicamente. Las BMBCs desgranulan en respuesta a antígeno, el cual es reconocido por una IgE específica y que se encuentra unida al receptor FcεRI; la cantidad de IgE unida a los receptores, así como la concentración de antígeno influyen en la respuesta celular. En nuestro caso 2×10^6 de BMBCs con un 100% de receptores ocupados, se estimularon con diferentes concentraciones de DNP/HSA (1, 3, 9, 27 y 81 μM) por 1 h. a 37°C; posteriormente las células se centrifugaron y se separó el sobrenadante para medir la liberación de β -hexosaminidasa. Así, tenemos que a una concentración de 9 ng/ml de DNP se produce la máxima respuesta que es de 63.2 ± 12.41 % de liberación de β -hexosaminidasa (Fig. 5); después, al ir aumentando la concentración de antígeno la respuesta disminuye gradualmente.

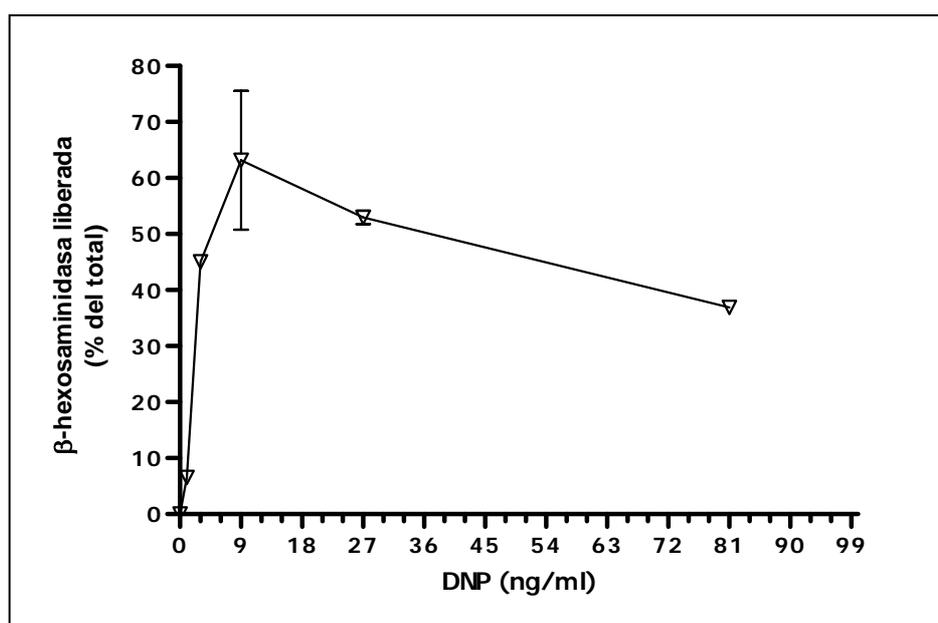


Fig. 5. Dosis respuesta a antígeno. 2×10^6 BMBCs fueron incubadas 1 hr con IgE-anti DNP a 37°C antes de ser estimuladas por 1 hr con diferentes concentraciones de DNP/HSA (1, 3, 9, 27 y 81 μM) a una temperatura de 37°C en Buffer Tyrode's/BSA. Después las células se centrifugaron a 4°C por 5 min y se separaron los sobrenadantes para determinar la cantidad de β -hexosanimidasa liberada.

VI. 2. La trombina induce desgranulación de las BMMC. Las células cebadas también responden a trombina desgranulando, aunque en menor grado comparada con la respuesta mediada por el receptor FcεRI. Para ver la respuesta a la TR por parte de las BMMCs se incubaron 2×10^6 de células con 0.5, 1, 1.5, 3 y 4.5 U/ml de TR por 1 h. a 37°C y se midió la liberación de β-hexosaminidasa. Desde 0.5 U/ml la respuesta a la trombina llega a su máximo que es de 18.86 ± 0.36 % de desgranulación y se mantiene mas o menos constante aunque aumentemos su concentración (Fig. 6). Este experimento se hizo con el fin de determinar la concentración de TR que se utilizaría para los siguientes experimentos, ya que se sabe que las MCs presentan su mayor respuesta de 0.5 a 1 U/ml de TR (Razin y Marx, 1984; González-Espinosa et al., 2003); para los siguientes experimentos se decidió usar una concentración de 1U/ml de TR pues a esta concentración obtuvimos una muy buena desgranulación.

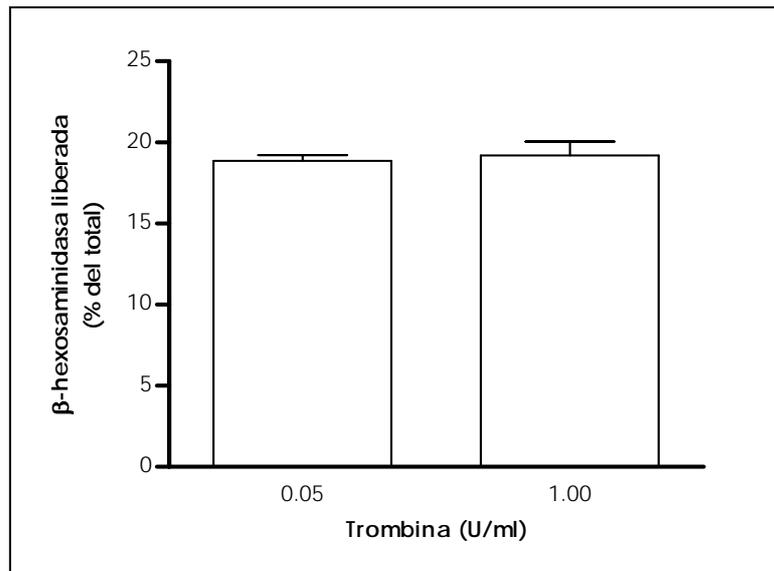


Fig. 6. Dosis respuesta a Trombina. BMMC fueron incubadas en buffer Tyrode's/BSA durante una hora en presencia de varias concentraciones de Trombina (0.5, 1, 1.5, 3 y 4.5 U/ml). Después de eso, las células fueron centrifugadas y el sobrenadante se utilizó en la determinación de la actividad de la β-Hexosaminidasa. En esta figura solo se muestran las desgranulación inducida por 0.5 y 1 U/ml de TR.

VI. 3. Un agonista PAR-1 induce desgranulación de las BMMCs pero no así un agonista PAR-2. Usando péptidos selectivos para el receptor PAR-1 (TRAP-6 cuya secuencia de aminoácidos es SFLLRN) y PAR-2 (PAR2-AP conformado por SLIGRL) se determinó qué subtipo de receptor está mediando la desgranulación en las BMMCs; pues se sabe que en células cebadas peritoneales de rata la desgranulación está mediada por ambos receptores. Para esto se estimularon 2×10^6 de células por una hora en ensayos de desgranulación con los péptidos selectivos; las concentraciones de los péptidos usadas en este experimento fueron de 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM . Las BMMCs respondieron al péptido selectivo para el receptor PAR-1 de una manera dependiente de la concentración a partir de concentraciones superiores a 1 μM , teniendo que a 10 μM la desgranulación es de $25.23 \pm 2.2 \%$ y a una concentración de 100 μM la desgranulación es de $37.48 \pm 3.36 \%$.

No se observó ninguna respuesta para el péptido agonista de PAR-2 a las mismas concentraciones utilizadas para el péptido PAR-1, Fig. 7A; lo cual nos indica que probablemente PAR-1 es el que está mediando la desgranulación por TR y la activación de PAR-2 no induce una respuesta secretora por parte de este tipo de células.

Para ver mejor la respuesta a TRAP-6 se hizo una curva concentración-respuesta con concentraciones que se fueron triplicando, comenzando de 1 hasta 81 μM usando 2×10^6 de células; teniendo una respuesta de $31.22 \pm 9.49 \%$ de liberación de β -hexosaminidasa a una concentración de 27 μM de TRAP-6, aumentando un poco con 81 μM del péptido (Fig. 7B). Con este experimento determinamos que a 27 μM de péptido nuestras células están presentando una muy buena respuesta secretora y es ésta la concentración que usamos en los siguientes experimentos.

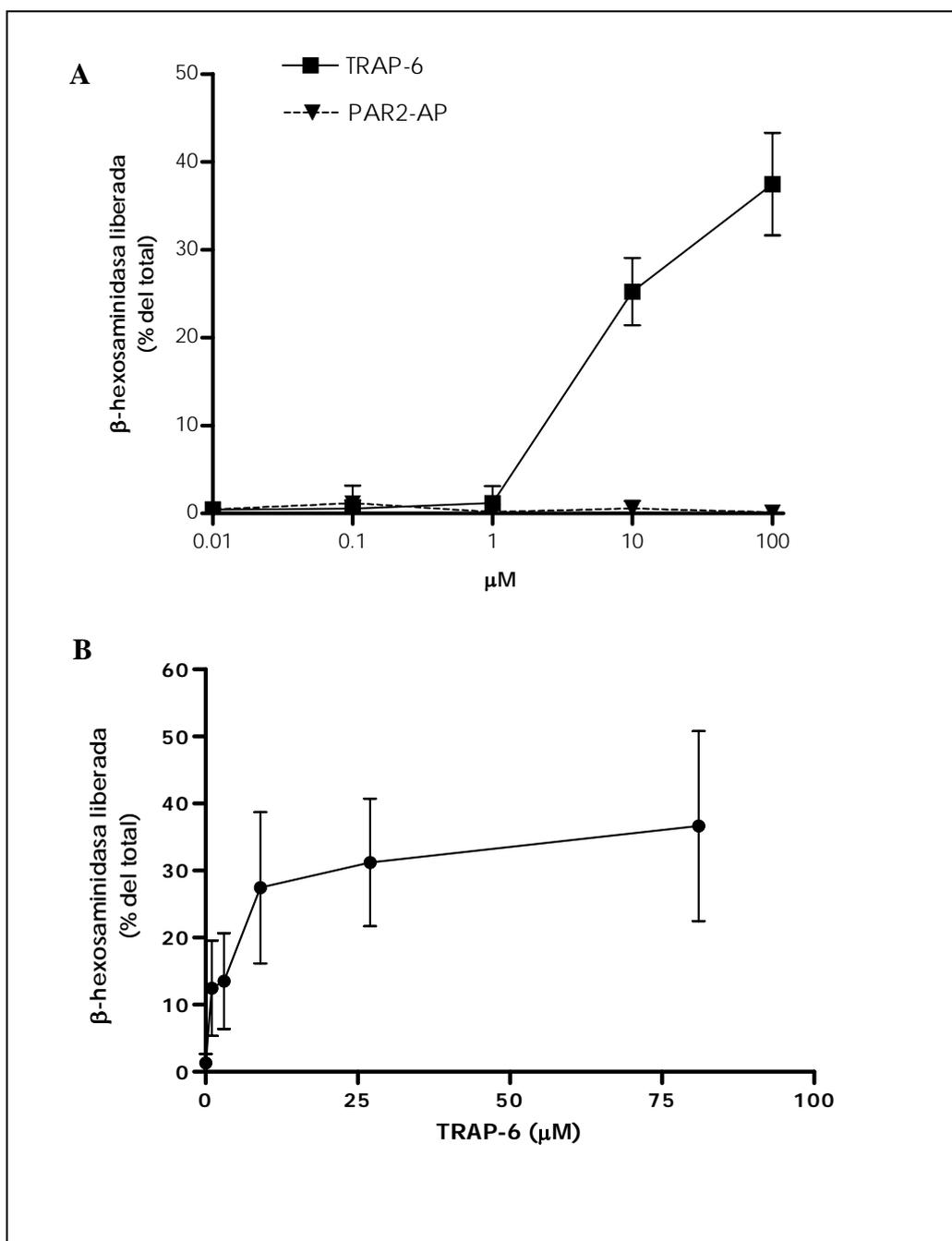


Fig. 7. Respuesta de las BMMC a TRAP-6 y PAR2-AP (agonistas selectivos para PAR-1 y PAR-2 respectivamente). 2×10^6 BMMCs fueron incubadas por 1 hr. en Buffer Tyrode's/BSA a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de TRAP-6 y PAR2-AP. (A) Se presenta la liberación de β -Hexosaminidasa en respuesta a TRAP-6 y PAR2-AP 0, 0.1, 1, 10 y 100 μM . (B) Dosis- respuesta a TRAP-6 en concentraciones 1, 3, 9, 27 y 81 μM .

VI. 4. Syk participa en la desgranulación inducida por trombina. Se sabe que la cinasa de tirosina Syk es importante en la vía de señalización del receptor FcεRI. Se trató de ver si Syk participa en la desgranulación de las células cebadas inducida por TR, de la misma forma que en la desgranulación inducida por antígeno y para esto se incubaron 2×10^6 células con piceatannol (PC) que es un inhibidor selectivo para Syk, en concentraciones crecientes de 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 μM , 15 min antes de que las células recibieran un estímulo de DNP (9ng/ml), TR (1U/ml) y TRAP-6 (27 μM) por 1hr; en la Fig.8 se muestran los resultados normalizados de los máximos. En esta figura podemos observar que la actividad de las BMCC en presencia de TR se reduce a

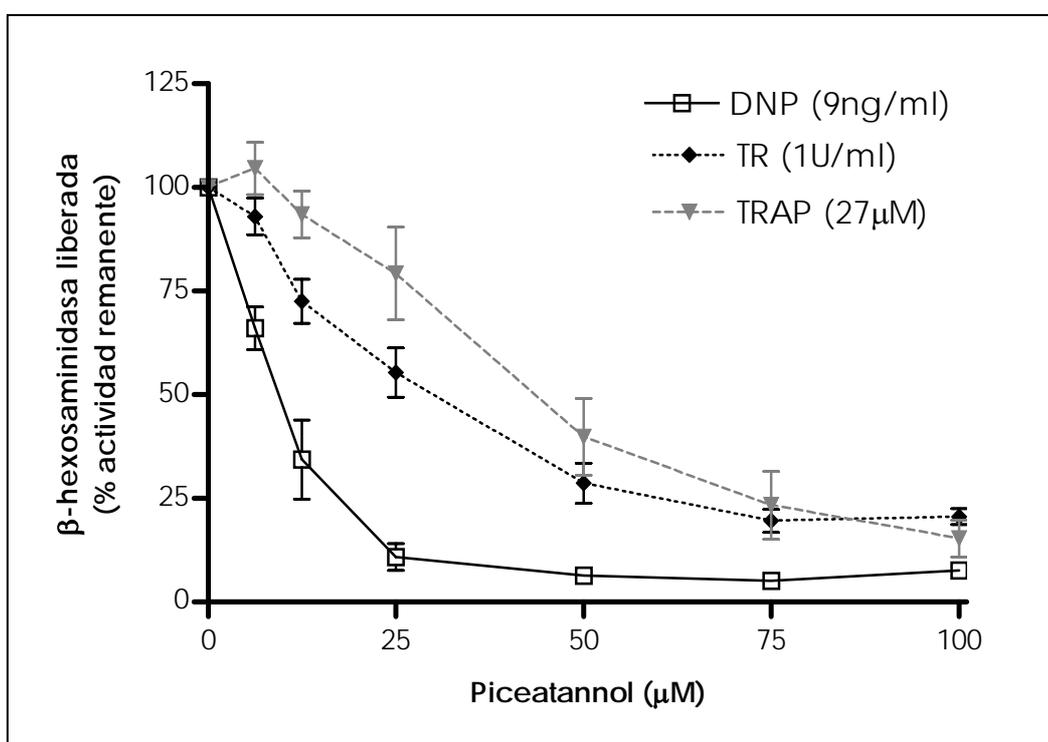


Fig. 8. Inhibición de la desgranulación inducida por DNP, TR y TRAP-6 con piceatannol (PC) un inhibidor de la cinasa de tirosina Syk. BMCCs fueron preincubadas con diferentes concentraciones de PC (6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 μM) antes de ser estimuladas con DNP (9ng/ml), TR (1U/ml) y TRAP-6 (27 μM). Las células activadas con DNP se preincubaron 1 hr a 37°C con IgE anti-DNP(300ng/millón de células) antes de la incubación con PC. Los datos fueron normalizados de los máximos de desgranulación (59.37 ± 7.05 % para DNP, 20.79 ± 2.93 % para TR y 26.06 ± 3.25 % para TRAP-6).

55.34 ± 5.94 % con 25 μM de PC, en tanto que células activadas con DNP reducen su actividad a 10.88 ± 3.24 % de actividad remanente a esta misma concentración de PC. Al ir aumentando la concentración de PC la respuesta a trombina sigue disminuyendo hasta 75 μM de PC donde se alcanza la máxima inhibición, pues presenta solo $19.58 \pm$

2.77 % de actividad secretora, en tanto que la actividad inducida por el péptido agonista PAR-1 se reduce al mínimo que es de 15.33 ± 4.4 % a 100 μM de PC.

Con esto vemos que la inhibición de la desgranulación en células activadas antigénicamente por PC es dependiente de la concentración y se alcanza un máximo de inhibición a partir de 25 μM de PC, sin embargo en células activadas con TR y TRAP-6 es necesario usar concentraciones mas elevadas de PC para obtener un máximo de inhibición.

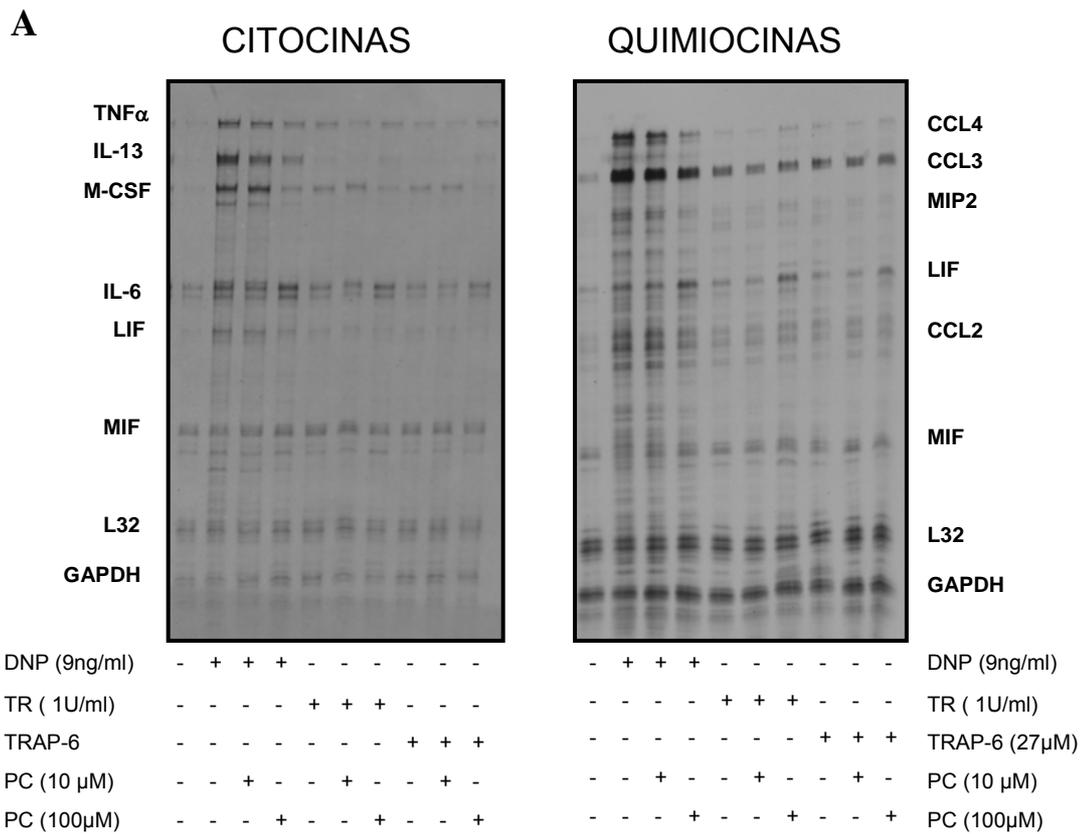
VI. 5. TR induce la expresión de citocinas y quimiocinas. Se ha descrito que distintos estímulos son capaces de promover la síntesis de las mismas citocinas de BMMC, pero difieren en sus niveles de expresión dependiendo del grado de estimulación (González-Espinosa, et al., 2003); en este trabajo se trato de corroborar la síntesis de citocinas inducida por TR y se comparó con la síntesis inducida por DNP, además se quiso saber si la síntesis de citocinas y quimiocinas era dependiente de Syk. Para eso se usaron 2×10^6 de BMMCs que fueron incubadas con DNP (30ng/ml.), TR (1 U/ml.) y TRAP-6 (27 μM) en presencia de 10 y 100 μM de PC en ensayos de liberación de β -hexosaminidasa; los resultados que se muestran en la Fig. 9C indican una inhibición casi total de la desgranulación en las células ante los tres estímulos (DNP, TR y TRAP-6) en presencia de 100 μM de PC.

Posteriormente se extrajo el RNA de estas células y se analizó la síntesis de citocinas y quimiocinas por RPA (ensayo de protección contra RNasa I). Los resultados se muestran en la Fig. 9.

La expresión de $\text{TNF}\alpha$, IL-13, LIF, IL-6 y M-CSF se ve afectada por PC en células activadas con DNP, mientras que MIF no parece afectarse por la presencia de PC. En células estimuladas con TR y TRAP-6 el perfil de expresión de citocinas es muy parecido entre ambos, que comparados con la expresión en células estimuladas con DNP es menor. En las células estimuladas con TR, $\text{TNF}\alpha$ se ve disminuida en su expresión por la presencia de 10 μM de PC, asimismo M-CSF disminuye un poco con 100 μM de PC, mientras que las demás parecen expresarse más con PC; es como si

concentraciones altas de PC permitieran su expresión. MIF es igual en todos los carriles, incluso en el basal. La expresión de IL-13 es apenas perceptible en BMMC estimuladas con TR y TRAP-6.

En lo que respecta a las quimiocinas; CCL2, CCL3, CCL4 y MIP-2 los niveles de mRNA para estas citocinas se ven afectados en presencia de PC en células estimuladas antigénicamente. Las células estimuladas con TR y TRAP-6 presentan como en el de citocinas un perfil de expresión de citocinas idéntico entre ambos, pero de menor magnitud que las células activadas con DNP. En células activadas con TR y TRAP-6, la expresión de CCL3 y CCL4 disminuye un poco con 10 μ M de PC pero parece recuperarse con 100 μ M de PC. MIF es otra de las quimiocinas que parece incrementarse cuando hay grandes concentraciones de PC en células activadas con TR; mientras que las demás quimiocinas parecen no sufrir cambios en su nivel de expresión por acción del PC con este tratamiento.



B

GEN	DNP			TROMBINA			TRAP-6			
	BASAL	PC		10 μM	100μM	10 μM	100μM	10 μM	100μM	
		10 μM	100μM							10 μM
TNF α	0,56	2,74	2,06	0,88	0,91	0,68	1,04	0,46	0,27	0,43
IL-13	0,41	6,38	4,26	1,07	0,32	0,42	0,63	0,24	0,26	0,32
M-CSF	0,42	4,49	4,29	0,7	0,93	1,56	0,85	0,73	0,69	0,34
IL-6	0,93	2,75	2,35	2,32	1,38	1,53	3,26	0,8	0,69	1,04
LIF	0,37	1,18	1,21	0,48	0,45	0,6	0,53	0,39	0,37	0,39
MIF	1,08	1,22	1,4	1,31	1,74	2,39	2,07	1,12	1,04	1,02
CCL-4	0,12	1,19	0,66	0,18	0,35	0,27	0,7	0,6	0,3	0,6
CCL-3	0,32	2,6	1,69	1,21	0,57	0,42	0,56	0,7	0,41	0,43
MIP-2	0,09	0,66	0,41	0,11	0,05	0,05	0,09	0,08	0,05	0,05
CCL2	0,23	0,74	0,48	0,27	0,15	0,17	0,17	0,17	0,13	0,13

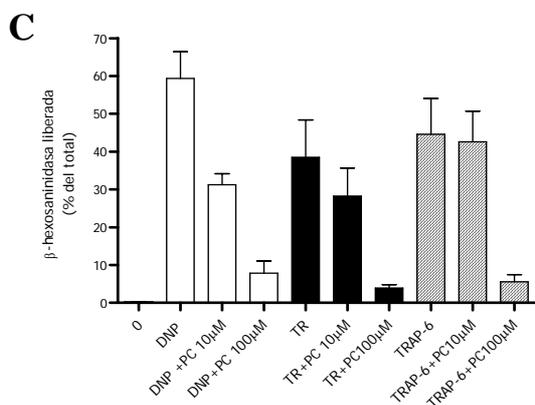


Fig. 9. La inhibición de Syk no altera la síntesis de citocinas y quimiocinas en las BMDCs activadas con trombina y TRAP-6. 2×10^6 células fueron preincubadas por 15 min con piceatannol 10 y 100 μ M antes de ser estimuladas con DNP/HSA, TR y TRAP-6 por 1 hr a 37°C. (A) después de la estimulación, las pastillas de células se usaron para extraer el RNA y detectar por RPA la síntesis de mRNA de citocinas y quimiocinas. (B) densitometría de la Fig. A, se usan unidades arbitrarias. (C) se muestra inhibición de la desgranulación con las concentraciones antes mencionadas de PC.

VI. 6. Participación de cinasas de la familia de Src en la señalización por trombina en BMMCs. Es evidente que en la desgranulación existe la participación de Syk en la vía del receptor de TR como en la del FcεRI, aunque esta no parece ser de la misma magnitud, pero existe otro grupo de cinasas de tirosina importantes para la vía de señalización del FcεRI que se encuentran antes de Syk, me refiero a las cinasas de la familia de Src: Lyn y Fyn.

Para averiguar si alguna cinasa de la familia de Src participa en la desgranulación inducida por TR se utilizó un inhibidor específico de éstas conocido como PP2. Se incubaron 2×10^6 células en presencia de 1, 5 y 10 μM de PP2 por 15 minutos a 37°C , después se estimularon las células con DNP (9 ng/ml), TR (1 U/ml) y TRAP-6 (27 μM) 1 hr a 37°C , posteriormente se centrifugó y se separaron los sobrenadantes para determinar la liberación de β -hexosaminidasa (Fig. 10), para apreciar mejor la acción de PP2 sobre las células se normalizaron los datos.

Así tenemos que la actividad secretora de las BMMCs en respuesta a DNP/HSA disminuye a $28.78 \pm 9.9 \%$ con $5 \mu\text{M}$ de PP2 y prácticamente se anula con $10 \mu\text{M}$ de PP2 ($2.09 \pm 2 \%$). La actividad en respuesta a TR cae a $68.41 \pm 13.87 \%$ con $5 \mu\text{M}$ y a $41.64 \pm 6.71 \%$ con $10 \mu\text{M}$ de PP2; Mientras que la respuesta a TRAP-6 baja a $72.93 \pm 5.84 \%$ con $5 \mu\text{M}$ y de ahí parece mantenerse la respuesta aun aumentando la concentración de PP2 a $10 \mu\text{M}$ ($69.96 \pm 3.63 \%$). Sin embargo a una concentración de $30 \mu\text{M}$ de PP2 se logró anular la liberación de β -hexosaminidasa por parte de la TR y TRAP-6 (datos no mostrados), aunque posiblemente a esta concentración la inhibición de la desgranulación no se le puede atribuir a una inhibición selectiva sobre las cinasas de la familia de Src sino también de alguna otra proteína.

Lo anterior da indicios de la participación de cinasas de la familia de Src en la vía de señalización de PAR-1, la cual sería menor que en la señalización del FcεRI, pues en este caso la respuesta se inhibió completamente.

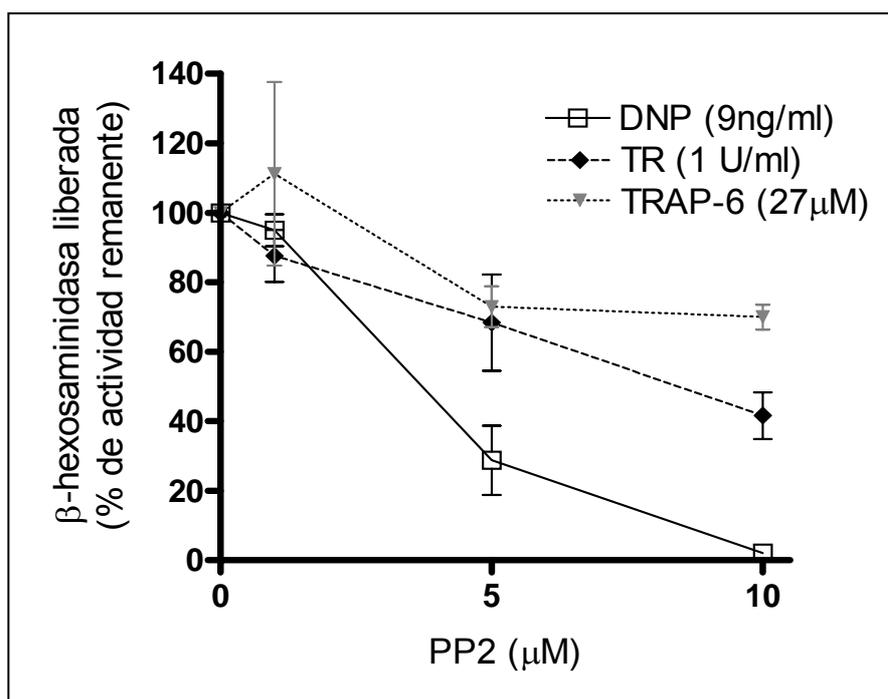


Fig. 10. inhibición de la desgranulación en BMMCs activadas con DNP, TR y TRAP-6 con PP2 un inhibidor de las cinasas de tirosina de la familia de Src. BMMCs fueron preincubadas 15 min. con PP2 (1, 5 y 10 μM) a 37°C en Buffer Tyrode's antes de ser estimuladas por 1 hr a 37°C con DNP (9ng/ml), TR (1U/ml) y TRAP-6 (27μM).

VI. 7. Participación de Fyn en la desgranulación inducida por trombina. Para saber si Fyn, una cinasa muy importante en la vía de señalización del FcεRI estaría participando en la vía de PAR-1, se usaron células cultivadas y diferenciadas a partir de médula ósea extraída de ratones que carecen de esta cinasa (Fyn^{-/-} o Fyn knockout). Se incubaron 2 x 10⁶ de BMMCs de ratones Fyn^{-/-} con los diferentes estímulos (DNP, TR y TRAP-6) por 1 hr. a 37°C; después se separaron los sobrenadantes para determinar el % de β-hexosaminidasa liberada y se comparó con la respuesta obtenida en BMMCs tipo silvestres (WT).

Las células $Fyn^{-/-}$ presentaron una respuesta menor a DNP/HSA (18.34 ± 3.43 %) comparada con la respuesta de células WT que fue de 43.98 ± 7.9 %; asimismo la respuesta de estas células a TR también fue menor (10.99 ± 2.18 %) comparada a la de las WT (20.7 ± 4.53 %), de la misma forma células $Fyn^{-/-}$ desgranularon menos con TRAP-6 (17.53 ± 4.69) que las WT (26.78 ± 3.8), aunque en este último caso las diferencias entre las respuestas presentadas por ambos tipos celulares no parecen ser estadísticamente significativas.

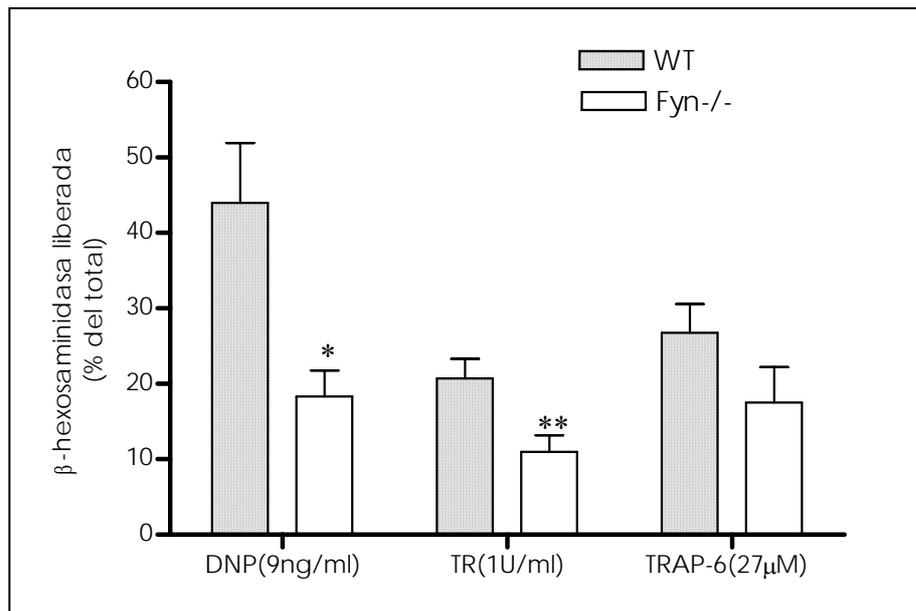


Fig. 11. Desgranulación inducida con DNP, TR y TRAP-6 en BMMC carentes de la cinasa de tirosina Fyn ($Fyn^{-/-}$). 2×10^6 células tipo silvestre (WT, wild tipe) y células $Fyn^{-/-}$ (Fyn knockout) fueron incubadas en tubos con tapón de rosca de 1.5 ml. con DNP, TR y TRAP-6 por 1 hr a 37°C en buffer Tyrodes/BSA, posteriormente se centrifugaron los tubos y se separaron los sobrenadantes mismos que se utilizaron para medir la cantidad de β -hexosaminidasa liberada. Se aplicó una prueba t de Student con una * $P < 0.05$ vs. WT+DNP, ** $P < 0.05$ vs. WT+TR.

VII. Discusión.

Las células cebadas responden a diversos estímulos, con distintos grados de desgranulación, la más dramática es la respuesta a antígeno mediada por el receptor para la IgE (conocido como FcεRI) en las reacciones alérgicas. Ensayos *in vitro* en donde se trata de igualar las condiciones presentes en las células cebadas de los organismos atópicos nos muestran que se puede alcanzar una desgranulación cercana al 70% como se aprecia en la Fig.5. Este nivel de desgranulación es realmente perjudicial para el organismo pues es capaz de llevarlo a la muerte.

La trombina es una proteasa generada en sitios de daño tisular que también puede inducir la desgranulación de las células cebadas aunque en una proporción menor. Las células cebadas derivadas de médula ósea, responden con un máximo de desgranulación a la TR a partir de una concentración de 0.5 U/ml, que es de cerca del 20 % de desgranulación (Fig. 6), esto quiere decir que a esta concentración la TR es capaz de activar a todos los receptores presentes en la membrana de las BMMC.

Diversos autores han detectado la síntesis de mRNA de los receptores PAR-1 y PAR-2 en las células cebadas peritoneales de rata (RPMC); la respuesta de estas células a TR y diversos péptidos agonistas de PAR-1, así como a tripsina y agonistas de PAR-2 también han sido reportados. Por ejemplo se ha visto que células peritoneales responden a TR y a la tripsina liberando histamina (1.3% y 15.4% respectivamente, Alic, et al., 2001); cuando son activadas con ligandos selectivos para PAR-1 y PAR-2 liberan una mayor cantidad de histamina (10% y 50% respectivamente, Nishikawa, et al., 2000). En lo que respecta a la liberación de β-Hexosaminidasa, en las RPMC se ha encontrado que ambos receptores median su liberación y esto se ha determinado también con la ayuda de PAR-APs selectivos; algo importante de mencionar es el hecho de que el péptido selectivo para PAR-2 utilizado en este trabajo (el PAR2-AP), cuya secuencia de aminoácidos es SLIGRL, induce el 20% de liberación de β-hexosaminidasa en las RPMC (Dugina, et al.,2003). Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que las BMMCs ocupadas en nuestros experimentos presentan los 4 tipos de receptores PAR, llegamos a pensar que en las BMMCs la desgranulación podría estar mediada por PAR-1 y PAR-2; y es que el uso de un péptido modificado (3-mercapto-propionyl-Phe-Cha-Cha-Arg-Lys-Pro-Ans-Lys-amida) reportado como antagonista de PAR-1 y que a la

vez es agonista para PAR-2 (Kawabata A., et al., 1999), nos hizo pensar en esta posibilidad, pues potenció la desgranulación inducida por TRAP-6 y produjo desgranulación de una forma dependiente de la concentración en las BMMCs (datos no mostrados). Nuestra primera idea fue que la activación de PAR-1 por TR, inducía la liberación de triptasa almacenada en los gránulos de las BMMCs, que podría activar de forma autocrina a los receptores PAR-2 presentes en la membrana. Así la respuesta a trombina sería en realidad el resultado de la activación de PAR1 por TR y PAR2 por la triptasa liberada de las células cebadas, sin embargo como se aprecia en la Fig. 7A el empleo de un agonista PAR-2, que en realidad es la secuencia de ligando atado de este receptor (ver tabla 2) no indujo desgranulación, por lo que se descarta la participación de PAR-2 en la respuesta mediada por TR. Esta diferencia en la respuesta al péptido selectivo para PAR-2 entre ambas subpoblaciones de MCs, puede ser atribuible a la llamada heterogeneidad de las MCs pues como se dijo anteriormente, las células cebadas presentan diferencias fenotípicas (diferencia en el contenido de sus gránulos y en la respuesta a un estímulo) que son el resultado de las condiciones del ambiente en donde se desarrollan, pues nuestras células conseguidas por cultivo son del tipo de las mucosales y las RPMCs son del tipo de las de tejido conectivo.

Una pregunta interesante es ¿la TR también podría estar activando a los otros PARs (PAR-3 y PAR-4) en las células cebadas?, y por tanto la respuesta secretora ¿podría ser el resultado de la suma de la respuesta de los tres receptores capaces de ser activados por TR?; esto es difícil de determinar, ya que para PAR-3 no se conoce un TRAP específico capaz de activarlo, lo que dificulta su estudio y para PAR-4 se podría utilizar un péptido selectivo como GYPGKV-NH₂, y ver si existe una respuesta secretora, aunque hay que recordar que para que TR active a este receptor las concentraciones deben de ser por lo menos 10 veces mayores a las usadas para activar a PAR-1, sin embargo no podemos descartar que exista una activación de PAR-4 utilizando a PAR-3 como cofactor.

Existe una diferencia entre la desgranulación inducida por TR (que podría llamarse el “ligando natural” de PAR-1) y el péptido TRAP-6; los datos reportados en la literatura de la liberación de histamina y β -hexosaminidasa por parte de las RPMCs muestran una mayor respuesta a los PAR-APs que a la TR y Tripsina en este tipo celular. En las Figs. 6 y 7 podemos observar que las BMMCs responden con una desgranulación mayor

cuando son activadas con TRAP-6 que cuando son activadas con TR. La capacidad de ciertas sustancias como el compuesto 48/80 y la sustancia P (un péptido) de atravesar la membrana plasmática y activar directamente a las proteínas G podría ser una posible explicación (Lorenz, et al., 1998); los PAR-APs pudieran estar actuando de la misma forma, pero esto no se ha comprobado. Además quizá los PAR-APs no son tan selectivos como se piensa, pues se ha propuesto que agonistas para PAR-1 pueden activar también a PAR-2 (Kawabata, et al., 1999).

Por otra parte Gordon, et al. (2000) encontraron que existe un aumento en la secreción de IL-6 por parte de una línea de células cebadas transformadas (línea C1.MC/C57.1) cuando las células se pretratan con TR antes de ser estimuladas antigénicamente. Cuando se ponen los estímulos por separado, la presencia de TR parece predisponer a las MCs a mostrar una mayor respuesta a un antígeno, lo que nos lleva a suponer de una posible participación de proteínas involucradas en ambas vías de señalización (Cross talk). Vliagoftis, (2002), ha propuesto además que en la cascada de señalización de PAR-1 en la adhesión a fibronectina de las células cebadas participan proteínas como Gi, Syk, PKC, y las MAPK. Ahora bien, si comparamos las proteínas involucradas en la vía de señalización del receptor FcεRI entonces vemos que algunas, como Syk y PKC participan en ambas vías. Esto nos llevó a preguntarnos si Syk estaría jugando un papel igualmente importante en la desgranulación mediada por TR como lo hace en la mediada por antígeno. Para contestar esta pregunta se aplicaron concentraciones crecientes del inhibidor selectivo para Syk conocido como Piceatannol, en la Fig.8 observamos que la desgranulación mediada por FcεRI cae casi totalmente a una dosis de 25 μM, mientras que la respuesta a TR disminuye solo un 50% aproximadamente y la de TRAP-6 solo una cuarta parte a esta misma concentración, pero cuando se aumentó la concentración de PC hasta 75 μM la inhibición de la respuesta a TR y el péptido TRAP-6 fue casi total. Esto nos habla de una participación de Syk en la señalización mediada por el receptor PAR-1 aunque ésta al parecer no es de la misma magnitud que en la respuesta antigénica.

En lo que respecta a la síntesis de citocinas y quimiocinas se ha descrito que los antígenos y la TR presentan un perfil de expresión similar aunque en el caso de la TR se presenta una menor síntesis de estos mensajeros como lo vemos en el quinto y octavo carril de ambos geles (citocinas y quimiocinas) de la Fig. 9B, donde las BMDCs se

estimularon con TR y TRAP-6 respectivamente, comparada con la síntesis presentada en células estimuladas antigénicamente (segundo carril). La síntesis de citocinas como TNF α , IL-13, M-CSF y LIF se ve afectada por la presencia de PC, así como también las quimiocinas CCL4, CCL3, CCL2 y MIP2 en las BMMCs activadas con DNP; mientras que en las células activadas por TR y TRAP-6 sólo TNF α y la quimiocina CCL3 sufren un decremento por la presencia de PC. Esto quiere decir que Syk regula positivamente y de manera importante la síntesis de TNF α , IL-13, M-CSF y de las quimiocinas CCL4, CCL3 y MIP-2 en la vía de señalización del Fc ϵ RI; en tanto que la respuesta transcripcional presentada por las BMMCs vía la activación de PAR-1 sólo M-CSF y CCL3 parecen necesitar de Syk. Esta diferencia en las citocinas y quimiocinas sintetizadas vía la activación del Fc ϵ RI y el PAR-1 puede deberse a que se pueden estar activando distintos factores de transcripción, pues las secuencias promotoras de los genes pueden presentar múltiples sitios de unión para factores de transcripción diferentes, por ejemplo CCL-2 presenta tres sitios de unión a NF κ B y tres para AP-1 (Adcock y Barnes, 1998), lo cual abre la posibilidad de que múltiples estímulos puedan llevar a la regulación de la expresión de estos genes, así aunque la respuesta antigénica y a TR lleve a la síntesis de las mismas citocinas, la síntesis de estas no parece seguir las mismas vías de señalización.

TNF- α es un caso interesante pues en células activadas con TR en presencia de 10 μ M de PC disminuye un poco su expresión, pero a 100 μ M parece recuperarse; en tanto que IL-6 aumenta su expresión a 100 μ M de PC. En células cebada incubadas solo con PC 100 μ M existe síntesis de citocinas mientras que células incubadas solo con 10 μ M de PC no se aprecia síntesis de citocinas (datos no mostrados); posiblemente esta recuperación del nivel de expresión de TNF- α y el aumento en la expresión de IL-6 se deba a la alta concentración de PC, o al dimetilsulfoxido (DMSO) que se utiliza para disolver el PC y poderlo almacenar en alícuotas; aunque la concentración de DMSO fue de alrededor de 0.05% del volumen total en los tubos con células, estas no presentaron desgranulación. Pero en células tratadas con 10 μ M de PC existe inhibición en algunas citocinas y a esta concentración de PC sin los activadores no existe síntesis de citocinas.

Existe controversia sobre la participación de Syk en la señalización de GPCRs; las conclusiones de Mócsai, et al. (2003), que descartan la participación de Syk en la señalización por GPCRs de células cebadas carentes de la cinasa Syk que fueron

activadas con adenosina, no son del todo convincentes pues en sus experimentos solo se observa que las MAPK no se fosforilan y no si existen defectos en la desgranulación; de igual manera Hirasawa, et al. (1995) descartan la participación de Syk en la activación de las MAPK y la liberación de ácido araquidónico en MCs de la línea celular RBL-2H3 con carbacol (que activa al GPCR muscarínico m1). Sin embargo otros datos muestran la participación de Syk en la activación de las MAPK, tras la activación del receptor muscarínico a acetilcolina m1 en la línea celular de linfoma aviar DT40; su fosforilación en células hepáticas JTC-27 en respuesta a angiotensina II y también su fosforilación de forma rápida en la activación de plaquetas por TR, lo que apoya la idea de que Syk sea una molécula importante en la vía de señalización de algunos GPCRs (Wan, et al., 1997; Tsuchida, et al., 2000; Taniguchi, et al., 1993).

Otra vía mediada por proteínas G pero donde no participa ningún receptor y en la cual se presume la participación de Syk es la activación de RPMCs via el compuesto 48/80, en donde la liberación de ácido araquidónico se ve afectada con piceatannol y la actividad de Syk disminuye en presencia de toxina pertusis, lo que sugiere que Syk estaría río abajo de una proteína Gi (Shefler y Sagi-Eisenberg, 2001).

Las cinasas de la Familia de Src son de suma importancia en la cascada de señalización del FcεRI en las MCs. Lyn y Fyn son las encargados de transducir la señal tras su unión y posterior fosforilación a los ITAM de las cadenas β y γ del receptor. Chen, et al., (1994) reportaron que Fyn y Src se fosforilan de una manera rápida tras la activación del receptor de TR en fibroblastos; estos datos nos hicieron preguntarnos si ¿acaso miembros de esta familia estarían involucrados en la señalización del receptor de TR en las BMMC's?. Los resultados aquí mostrados confirman una participación parcial de cinasas de la familia de Src, pues existe una inhibición de la desgranulación en células activadas con TR en presencia de 10 μM de PP2 aunque esta inhibición es de solo del 50% de la respuesta, en cambio en la activación con DNP la inhibición es total a esta concentración.

La disminución parcial en la desgranulación presentada por las células Fyn^{-/-} al tratamiento con TR indican claramente que Fyn juega un papel importante en la respuesta a TR por parte de la BMMC's (Fig. 11); aunque su papel podría ser distinto que en la vía de señalización del FcεRI.

La participación de Hck en la activación del receptor para la IL-8 sugiere un posible papel de estas cinasas en la activación de células cebadas; pues se ha visto que Hck forma un complejo junto con la β -arrestina, la cual está implicada en el proceso de desensibilización del receptor para IL-8; este complejo se une a los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares y podría estar ayudando al tráfico y la liberación del contenido de los gránulos (Barlic, et al., 2000).

Otros resultados de ensayos *in Vitro* sugieren que Src y Hck pueden ser activadas directamente por proteínas Gai y Gas, esta activación parece ser independiente de los dominios SH3 y SH2 de estas proteínas (Ma Y., et al., 2000). Sin embargo se desconoce cuál es la forma en que se esté activando Fyn y si se asocia con otras proteínas o no en la vía de señalización de PAR-1 en las BMMCs. Los resultados presentados en este trabajo apoyan la idea de que cinasas de la familia de Src son moléculas que participan en la señalización de GPCRs.

Sin duda una de las cualidades de las MCs tiene que ver con el poder de estas células para comunicarse con otras ya sean cercanas o lejanas, y es que la gran diversidad de mediadores contenidos en sus gránulos y los que se sintetizan tras su activación como lo vemos en la figura 9 nos hace pensar en una multitud de eventos que se desencadenan tras una lesión que active la cascada proteolítica de coagulación y la formación de TR; aquí las MCs juegan papeles fundamentales ya que son muy importantes en el proceso de inflamación pues incrementan la permeabilidad vascular tras la activación de PAR-1 y posterior secreción de histamina (Kawabata, et al., 1999), la migración de leucocitos pues secretan una multitud de quimiocinas (Strukova, 2001) y también participan en la reparación tisular secretando triptasa, TNF- α y VEGF que estimulan la angiogénesis (Ribatti, et al., 2004).

Finalmente en el esquema de la figura 12 se propone un modelo de activación del receptor PAR-1 en las células cebadas, además de la posible cascada de señalización que se activa para poder llevar a la desgranulación y la síntesis de citocinas. Este modelo está basado en resultados obtenidos en el laboratorio que como se comenta brevemente en la introducción existe participación de Gi, PI3K, AKT, MAPK y PKC. En esta tesis se demuestra que la TR activa a las BMMCs vía PAR-1, así como también

demostramos que parte de la desgranulación depende de Syk y de Fyn, aunque desconocemos como se activan y como es que participan estas cinasas.

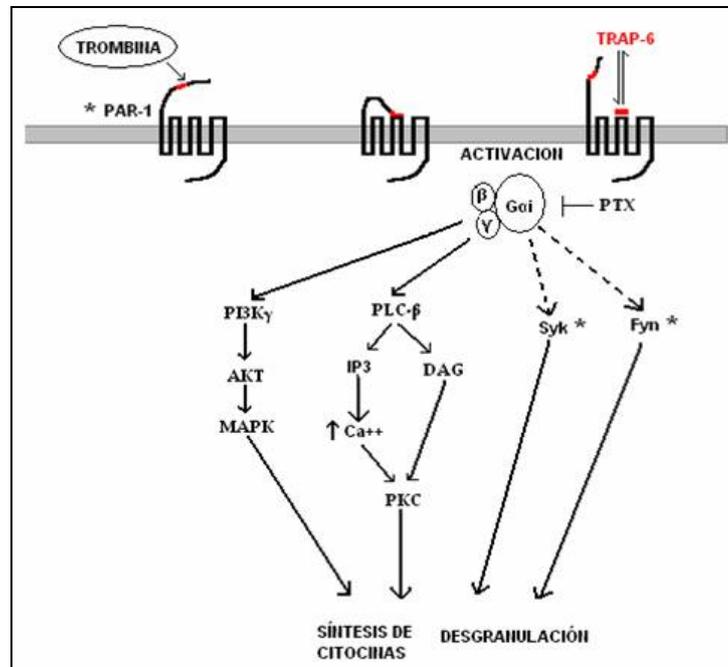


Fig.12. Vía de señalización del receptor PAR-1 en BMMCs. La activación de PAR-1 por TR y TRAP-6 produce un cambio conformacional en el receptor que activa a una proteína Gi la cual a su vez, puede activar diversos blancos río debajo de la cascada de señalización, como PI3K γ , PLC- β , Syk y Fyn; que trae como consecuencia la liberación de Ca²⁺ necesaria para la desgranulación y la activación de factores de transcripción para la síntesis de citocinas. En la presente tesis se demuestra (*) que en las BMMCs la respuesta a TR está mediada por el receptor PAR-1, y que la desgranulación depende en una parte de las cinasas de tirosina Syk y Fyn, además de que Syk también interviene en la síntesis de algunas citocinas.

PERSPECTIVA

En el futuro, el estudio de las acciones de la TR sobre las MCs ayudara a una mejor comprensión del papel que desempeñan estas células en la inflamación asociada a la coagulación sanguínea; asimismo el esclarecimiento de la vía de señalización intracelular que dispara la activación del receptor PAR-1 en MCs, brindará un panorama más amplio de las proteínas que intervienen en la cascada de señalización, permitiendo con esto el conocimiento de blancos terapéuticos, que ayuden a modular la respuesta de las células cebadas a TR, incluso la respuesta de otras células en la cascada proteolítica de coagulación.

VIII. Conclusiones.

- 1) La trombina induce aproximadamente un 20% de desgranulación en las BMMCs.
- 2) La desgranulación inducida por TR en BMMCs está mediada por el receptor PAR-1, mientras que la activación de PAR-2 no induce desgranulación como en otras subpoblaciones de células cebadas.
- 3) Syk participa de forma importante en la respuesta secretora inducida por TR.
- 4) La trombina induce la síntesis *de novo* de las mismas citocinas y quimiocinas inducidas en la activación antigénica de las BMMCs, pero ésta es menor que en la respuesta antigénica (aproximadamente una tercera parte).
- 5) Syk participa en la síntesis *de novo* de TNF- α , M-CSF y CCL3 en BMMCs activadas por TR.
- 6) Existe participación de cinasas de la familia de Src en la vía de señalización de PAR-1 en BMMCs, específicamente Fyn es una cinasa de la familia de Src implicada en la respuesta de las BMMCs en la vía del receptor de TR aunque podría no ser la única.
- 7) La participación de dos cinasas fundamentales de la respuesta antigénica como Syk y Fyn, en la activación de las BMMCs por TR nos hace pensar en un posible “crosstalk” entre las dos vías de señalización intracelular; la del Fc ϵ RI y la de PAR-1.

IX. ANEXO. Preparación de soluciones.

Medio de cultivo RPMI

RPMI medio wo/glutamina (biofluidos P102-500) 500ml
Penicilina-estreptomicina-glutamina (Gibco BRL10378-016) 6ml
Hepes Buffer 1M (Gibco BRL15630-080)12.5ml
NEAA 100 X (biofluidos 333-100) 5ml
 β -Mercaptoetanol (Sigma M7522)1. 100-175 ml.
Suero fetal bovino 100% 100ml
IL-3 20ng/ml
SCF 20ng/ml (opcional)

Buffer Tyrode´s/BSA

NaCl ----- 7.88 gr.
KCl ----- 0.372 gr.
MgCl₂ ----- 0.203 gr.
CaCl₂ ----- 0.264 gr.
Glucosa ----- 1.009 gr.
Hepes 1M pH 7.0 ----- 20 ml.
Albúmina ----- 0.5 gr.
Ajustar pH a 7.4
Aforar a 1L
Guardar filtrado y estéril a 4°C

PNAG

P-nitrofenil N-Acetil- β -glucosamida

Se prepara un buffer de citratos 0.1M pH4.5

Mezclar:

Ac. Cítrico 0.1M -----26.5ml/50ml

Citrato de sodio 0.1M----- 23.25 ml/50ml

Añadir PNAG 1mM

Solución “stop” β -hexosaminidasa

0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃

Pesar:

1.05g Na₂CO₃

0.840g NaHCO₃

Diluir en 100ml de H₂O

Gel RPA

Solución de acrilamida..... 90ml.

Persulfato de amonio al 10%..... 1.25 ml.

TEMED..... 31 μ l.

Solución de acrilamida

Acrilamida 5.7%

Bisacrilamida 0.3%

Urea 42%

Disolver en TBE 1X

TBE 5X

Para 1L

Tris base ----- 54g

Ácido bórico ----- 27.5g

EDTA 20 ml 0.5M pH 8.

ABREVIATURAS

ATP.....	Adenosina trifosfato
BMMCs.....	Células cebadas derivadas de médula ósea.
cAMP.....	Adenosina monofosfato cíclico.
DAG.....	Diacilglicerol.
FcεRI.....	Receptor 1 de alta afinidad para la fracción Fc de la inmunoglobulina E.
Fyn ^{-/-}	Ratones ó células Fyn knockout
GDP.....	Guanosina difosfato.
GTP.....	Guanosina trifosfato.
GPCRs.....	Receptores acoplado a proteína G.
IgE.....	Inmunoglobulina E.
IL-3.....	Interleucina 3.
IP3.....	Inositol 1,4, 5 trifosfato.
ITAM.....	Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina.
MCs.....	Células cebadas.
PAR.....	Receptor activado por proteasas.
PAR2-AP.....	Péptido activador de PAR-2.
PC.....	Piceatannol, inhibidor selectivo de la cinasa Syk.
PI3K.....	Fosfatidilinositol 3-cinasa.
PKC.....	Proteína Cinasa C.
PLCγ.....	Fosfolipasa Cγ.
PP2.....	Inhibidor de cinasas de la familia de Src.
RPMC.....	Células cebadas peritoneales de rata.
TR.....	Trombina.
TRAP.....	Péptido activador del receptor de trombina.
WT.....	Ratones ó células tipo silvestre.

X. BIBLIOGRAFIA

Abbas A. K., Lichtman A. H., y Pober J. S., “inmunología celular y molecular”. 4ª. Edición; McGraw-Hill interamericana. España, 2002.

Adcock I. M. y Barnes., “Transcription Factors in Asthma”. En Asthma and allergic diseases. Academic Press Ltd., 1998.

Alic A., Hashemi-Shirazi N. y Pearce F. L., “Protease-activated receptor and mast cell activation”. *Inflamm. Res.* 50, suplemento 2: S57-S58, 2001.

Barlic J., Andrews J. D., Kelvin A. A., Bosinger S. E., DeVries M. E., Xu L., Dobransky T., Feldman R. D., Ferguson S. S. G. y Kelvin D. J., “Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through β -arrestin by CXCR1”. *Nat. Immunol.* 1: 227-233, 2000.

Blank U. y Rivera J., “The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis”. *TRENDS in immunology.* 35: 266-273, 2004.

Blume-Jensen P. y Hunter T., “Oncogenic kinase signalling”. *Nature.* 411: 355-365, 2001.

Buckland J., “Mast cells act by remote control”. *Nature Rev.*, Vol. 3, p.927, Dec. 2003.

Castells M. C., “Biología celular y molecular del mastocito”. *Rev. Esp. Alergol. Immunol. Clin.* 6: 327-339, 1997.

Chen Y., Pouyseégur J., Courtneidge S. A. y Obberghen-Schilling E. V., “Activation of Src family kinase activity by the G Protein-coupled thrombin receptor in growth-responsive fibroblasts”. *J. Biol. Chem.* 269: 27372-27377, 1994.

Coughlin S. R., “How the protease thrombin talks to cells”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 11023-11027, 1999.

Coughlin S. R., "Thrombin signalling and protease-activated receptors". *Nature*. 407: 258-264, 2000.

Dugina T. N., Kiseleva E. V., Glusa E., y Strukova S. M., "Activation of mast cells induced by agonist of proteinase-activated receptors under normal conditions and during acute inflammation in rats". *Eur. J. Pharmacol.* 471: 141-147, 2003.

Galli S. J., Kalesnikoff S. Grimaldeston M. A., Piliponsky A. M., Williams C. M. y Tsai M., "Mast cells as "Tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances". *Annu. Rev. Immunol.* 23: 749-786, 2005.

Galli S. J., Nakae S., y Tsai M., "Mast cell in the development of adaptive immune responses". *Nat. Immunol.* 2: 135-142, 2005.

Gartner L. P., Hiatt J. L. *Texto atlas de histología*. . Mc Graw Hill-Interamericana. México. 2002.

Gonzalez C., *Estudios moleculares sobre las alergias*". Avance y perspectiva, octubre-noviembre, 257-263, 2003.

González-Espinosa C., Odom S., Olivera A., Hobson J. P., Cid M. E., Oliveira-dos-Santos A., Barra L., Spiegel S., Penninger J. M. y Rivera J., "Preferential signalling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells". *J. Exp. Med.* 11: 1453-1465, 2003.

Gordon J. R., Zhang X., Stevenson K. y Cosford K., "Thrombin induces IL-6 but not TNF α secretion by mouse mast cells: threshold-level thrombin receptor and very low level Fc ϵ RI signaling synergistically enhance IL-6 secretion". *Cellular Immunology*. 205: 128-135, 2000.

Hamm H. E., "The many faces of G protein signalling". *J. Biol. Chem.* 273: 669-672, 1998.

Hirasawa N., Scharenberg A., Yamamura H., Beaven M. A. y Kinet J. “ A requirement for Syk in the activation of the microtubule-associated protein kinase/phospholipase A2 pathway by FcεRI is not shared by a G protein-coupled receptor”. J. Biol. Chem. 270: 10960-10967, 1995.

http://jaxmice.jax.org/strain/002271_3.html (esta página contiene datos sobre los ratones de la cepa 129-*Fyn*^{tm1Sor/J})

http://jaxmice.jax.org/strain/002448_3.html (esta página contiene los datos de los ratones de la cepa 129S1/SvImJ)

Ishihara H., Connolly A.J., Zeng D., Kahn M. L., Zheng Y. W., Timmons C., Tram T. y Coughlin S. H. “Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans”. Nature. 386: 502-506, 1997.

Kawabata A., Saifeddine M., Al-Ani B., Leblond L. y Hollenberg M. D., “Evaluation of proteinase-activated receptor-1 (PAR1) agonists and antagonists using a cultured cell receptor desensitization assay: activation of PAR2 by PAR1-targeted ligands”. J Pharmacol Exp Ther. 288: 358-370, 1999.

Kawabata A., Kuroda R., Nishikawa H., Asai T., Kataoka K. y Taneda M., “Enhancement of vascular permeability by specific activation of protease-activated receptor-1 in rat hindpaw: a protective role of endogenous and exogenous nitric oxide”. British J. of Pharmacology. 126: 1856-1862, 1999.

Lane D. A., Philippou H. y Huntington J. A., “Directing thrombin”. Blood. 106: 2605-2612, 2005.

Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudara P., Baltimore D. y Darnell J. “Biología celular y molecular”. Editorial medica panamericana., 2ª reimpresión. España, 2003.

Lorenz D., Wiesner B., Zipper J., Winkler A., Krause E., Beyermann M., Lindau M. y Biernat M., “Mechanisms of peptide-induced mast cell degranulation”. J. Gen. Physiol. 112: 577-591, 1998.

Ma Y., Huang J., Ali S., Lowry W. y Huang X., "Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins". *Cell*, 102: 635-646, 2000.

Marinissen M. J. y Gutkind J. S., "G-protein-coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms". *TRENDS in Pharmacological Science*. 22: 368-376, 2001.

Marshall J. S., "Mast-cell responses to pathogens". *Nature Rev. Immunol.* 4: 787-799, 2004.

Milligan G. y Kostenis E., "Heterotrimeric G-proteins: a short history". *British J. of Pharmacology*. 147: S46-S55, 2006.

Mócsai A., Zhang H., Jakus Z., Kitaura J., Kawakami T. y Lowell C. A., "G-protein-coupled receptor signalling in Syk-deficient neutrophils and mast cells". *Blood*. 101: 4155-4163, 2003.

Nakanishi-Matsui M., Zheng Y., Sulciner D. J., Weiss E. J., Ludeman M. J. y Coughlin S. R. "PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin". *Nature*. 404: 609-613, 2000.

Nishikawa H., Kawabata A., Kuroda R., Nishida M., y Kawai K., "Characterization of protease-activated receptor in rat peritoneal mast cells". *Jpn. J. Pharmacol.* 82: 74-77, 2000.

Pardo A. y Selman M., "Los animales transgénicos en el progreso de la investigación biomédica". *Ciencia*, 53: 43-48, 2002.

Pease J. E. y Williams T. J., "The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy". *British J. Pharmacology*. 147, S212-S221, 2006.

Razin E. y Marx G., "Thrombin-induced degranulation of cultured bone marrow-derived mast cells". *J Immunol.* 133: 3282-3285, 1984.

Reed C. E., y Kita H., "The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases". *J. Allergy. Clin. Immunol.* 114: 997-1008, 2004.

Ribatti D., Crivellato E., Roccaro A. M., Ria R. y Vacca A., "Mast cell contribution to angiogenesis related to tumor progression". *Clin. Exp. Allergy.* 34: 1660-1664, 2004.

Rydel T. J., Yin M., Padmanabhan K. P., Blankenship D. T., Cardin A. D., Correa P. E., Fenton II J. W. y Tulinsky A., "Crystallographic structure of human γ -trypsin". *J. Biol. Chem.* 269: 22000-22006, 1994.

Shefler I. y Sagi-Eisenberg R., "G_i-mediated activation of Syk kinase by the receptor mimetic basic secretagogues of mast cells: Role in mediating arachidonic acid/metabolites release". *J. Immunology*, 167: 475-481, 2001.

Siriganian R.P., Zhang S., Suzuki K., y Sada K., "Protein tyrosine Kinase Syk in mast cell signaling". *Mol. Immunol.* 38: 1229-1233, 2001.

Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V., Rottenholl A., Moormann C., Vergnolle N., Luger T. A., y Hollenberg M. D., "Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response". *Endocrine Rev.* 26: 1-43, 2005.

Stenton G. R., Nohara O., Déri R. F., Vliagoftis H., Gilchrist M., Johri A., Wallace J. L., Hollenberg M. D., Moqbel R. y Befus A. D., "Proteinase- Activated Receptor (PAR)-1 and -2 agonists induce mediator release from mast cells by pathways distinct from PAR-1 and PAR-2". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302: 466-474, 2002.

Strukova S. M., "Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues". *Biochemistry (Moscow)*, 66: 8-18, 2001.

Taniguchi T., Kitagawa H., Yasue S., Yanagi S., Sakai K., Asahi M., Ohta S., Takeuchi F., Nakamura S. y Yamamura H. "Protein-tyrosine kinase p72syk is activated by

thrombin and is negatively regulated through Ca^{2+} mobilization in platelets". *J. Biol. Chem.* 268: 2277-2279, 1993.

Tsuchida S., Yanagi S., Inatome R., Ding J., Hermann P., Tsujimura T., Matsui N. y Yamamura H. "Purification of a 72-kDa protein-tyrosin kinase from rat liver and its identification as Syk: Involvement of Syk in signaling events of hepatocytes". *J. Biochem.* 127: 321-327, 2000.

Turner M., Mee P. J., Costello P. S., Williams O., Price A. A., Duddy L. P., Furlong M. T., Geahlen R. L. y Tybulewicz V. L. J., "Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk". *Nature.* 378: 298-302, 1995.

Vliagoftis H., "Thrombin induces mast cell adhesion to fibronectin: evidence for involvement of Protease-Activated Receptor-1". *J. Immunol.* 169: 4551-4558, 2002.

Vliagoftis H. y Befus A. D., "Rapidly changing perspectives about mast cell at mucosal surfaces". *Immunological Rev.* 206: 190-203, 2005.

Vu T., Wheaton V. I., Hung D. T., Charo I. y Coughlin S. R. "Domains specifying thrombin-receptor interaction". *Nature.* 353: 674-667, 1991.

Wan Y., Bence K., Hata A., Kurosaki T., Veillette A. y Huang X., "Genetic evidence for a tyrosine kinase cascade preceding the mitogen-activated protein kinase cascade in vertebrate G protein signalling". *J. Biol. Chem.* 272: 17209-17215, 1997.

Wilhem D.L., Yong L.C. y Watkins S. G., "The Mast Cell: Distribution and maturation in the rat". *Agents and Actions.* 8: 1-2, 1978.

Xu W., Andrsen H., Whitmore T. E., Presnell. S. R., Yee D. P., Ching A., Gilbert T., Davie E. W. y Foster D. C. "Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6642-6646, 1998.