

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**“EFECTO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES
EN LAS CÉLULAS CEBADAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

Presenta

YOLANDA MENDOZA RODRÍGUEZ

Directora de tesis: Dra. Samira Muñoz Cruz

Asesor Interno: M. en IBSH. Angélica Flores Ramirez



México D.F. Noviembre, 2012



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 ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **MENDOZA RODRÍGUEZ YOLANDA**, con número de cuenta **405019182**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **28** del mes de **noviembre** de 2012 a las **9:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

VOCAL DRA. SAMIRA MUÑOZ CRUZ*

SECRETARIO M. en IBSh ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

SUPLENTE M. en C. MARISELA VALDES RUIZ

SUPLENTE DRA. JUANA MONROY MORENO

El título de la tesis que presenta es: **EFFECTO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES EN LAS CÉLULAS CEBADAS.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABERÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 29 de octubre de 2012.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO
DR. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Samira Muñoz Cruz

Una parte de este trabajo se realizó en el Instituto de Ciencias Biomédicas UNAM, bajo la asesoría del Dr. Jorge Morales Montor, así como la citometría de flujo bajo la asesoría de la Dra. Karen Nava Castro.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a las persona que a pesar de tanto y tanto nunca han dejado de creer en mí, ni de sentirse orgullosas de todo lo que hago...

Mi madre: María Esther Rodríguez Trejo

Por su paciencia interminable, su inagotable comprensión y sobre todo, por todo ese amor que sólo ella como madre sabe dar, alentándome así cada día. Desde el principio me dijo que no sería fácil pero que al final todo era posible y ya lo creo, porque la veo y sé que es un ejemplo de perseverancia como lo predica.

A mi padre: **José Mendoza** quien a pesar de no estar con el me ha apoyado mucho en todas las decisiones que he tomado y que al final sé que se siente orgulloso de mi, además de que lo admiro por ser una persona fuerte a pesar de las adversidades.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por haberme permitido ser parte de la mejor Universidad de México y una de las mejores de América Latina.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** por haberme admitido y continuar con mi formación académica, así como a todos los maestros que con tanta paciencia me aportaron su valioso conocimiento.

A mi directora de tesis:

Dra. Samira Muñoz Cruz

“El arte y la ciencia no bastan, sino que es, además, indispensable la paciencia”

Johann Wolfgang von Goethe

Por más que busqué las palabras precisas para agradecer todo lo que hizo por mí no las encontré, y es que un simple gracias no me alcanzaría para agradecerle la enorme paciencia, confianza y comprensión que me brindó. Además del el conocimiento tan valioso que aprendí de ella y que contribuyó a mi formación académica porque es una investigadora ejemplar. Y sí, aunque sé que muchas veces la hice desatinar siempre estuvo dispuesta a enseñarme y apoyarme para no desistir. Tal vez un infinito gracias debería estar plasmado aquí...

A mi asesora interna:

M. en IBSH. Angélica Flores Ramirez

Por haber depositó en mí su confianza y el haberme alentado a continuar con este trabajo por mostrar interés para que lo terminara y no me quedara a mitad del camino, por decirme alguna vez que por más difíciles que fueran las cosas o las personas no debía desistir. Gracias también por todas las sugerencias que aportó en este trabajo y el seguimiento del mismo hasta su conclusión.

Al **Dr. Jorge Morales Montor**, por haberme recibido en su laboratorio y haber formado parte de su grupo de trabajo además por su importante aportación de conocimiento en esta investigación y por sus consejos para continuar adelante ya que hay muchas cosas por saber todavía.

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”
Isaac Newton

A la **Dra. Karen Nava Castro**, quien amablemente me apoyó para realizar los experimentos que requirieron la citometría de flujo.

A mis amigos:

Angie: “La amistad es maravillosa porque es libre: no espera nada, lo da todo y se encuentra sin buscarla”

Por su valiosa y desinteresada amistad, que me ha dado y porque me ha apoyado en todo momento sin esperar nada a cambio además de enseñarme tantas cosas que no comprendía. Pero sobre todo por su amistad

Janeth: “El verdadero amigo jamás se interpone en tu camino, a menos que vayas cayendo cuesta abajo”. De manera especial por impulsarme a terminar con este trabajo que tanto ha costado además y por haberme dado tantos consejos recordándome cada día lo mucho que me quiere.

A mis compañeros de laboratorio **Nelly, Rosalía, Itztli, Eli, Monse, Ana, Cristián, Hugo, Nashla, Armando, Víctor, MarIsa, Jonathan, Valeria, Ricardo, Paul, Lore y Lorena Chávez** quienes amablemente me brindaron su apoyo.

Al programa de COMECYT por haberme otorgado el apoyo para tesis de licenciatura de la convocatoria del año 2011.

ÍNDICE GENERAL	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1 Células cebadas	5
3.2 Participación de las células cebadas en la alergia	9
3.3 Prevalencia mundial de enfermedades alérgicas	10
3.4 Factores externos que modulan la respuesta alérgica	11
3.5 Efectos de las hormonas esteroides sexuales en las células cebadas	12
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
5. HIPÓTESIS	15
6. OBJETIVO GENERAL	15
6.1 Objetivos particulares	15
7. MATERIAL Y MÉTODOS	16
7.1 Obtención y purificación de las células cebadas de peritoneo de rata	16
7.2 Efecto directo de esteroides sexuales en la liberación de histamina en CCP de ratas macho y hembra.	17
7.3 Liberación de histamina de CCP de ratas hembra y macho pretratadas con hormonas sexuales y estimuladas con sustancia P	18
7.4 Expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho estimuladas con esteroides sexuales	19
7.5 Expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho	

estimuladas con IgE y con esteroides sexuales	20
7.6 Análisis estadístico	21
8. RESULTADOS	22
8.1 Efecto directo de esteroides sexuales en la liberación de histamina en CCP de ratas hembra y macho	22
8.2 Efecto de los esteroides sexuales en la liberación de histamina inducida por sustancia P, en CCP de ratas hembra y macho	25
8.3 Efecto directo de los esteroides sexuales en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho	30
8.4 Efecto de los esteroides sexuales en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho sensibilizadas con IgE	34
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
10. CONCLUSIONES	40
11. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comunicación neuro- inmuno- endócrina

Figura 2. Participación de las células cebadas en la respuesta alérgica

Figura 3. Células cebadas teñidas con azul de toluidina

Figura 4. Efecto de la progesterona en la liberación de histamina en CCP de ratas macho y hembra

Figura 5. Efecto de la testosterona en la liberación de histamina en CCP de ratas hembra y macho

Figura 6. Efecto de la dihidrotestosterona en la liberación de histamina en CCP de ratas macho y hembra

Figura 7. Efecto del estradiol en la liberación de histamina en CCP de ratas macho y hembra

Figura 8. Efecto de la progesterona en la liberación de histamina inducida por sustancia P, en CCP de ratas macho y hembra.

Figura 9. Efecto de la testosterona en la liberación de histamina inducida por sustancia P, en CCP de ratas macho y hembra

Figura 10. Efecto de la dihidrotestosterona en la liberación de histamina inducida por sustancia P en CCP de ratas macho y hembra

Figura 11. Efecto del estradiol en la liberación de histamina inducida por sustancia P, en CCP de ratas macho y hembra

Figura 12. Efecto del estradiol en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho

Figura 13. Efecto de la progesterona en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho

Figura 14. Efecto de la testosterona en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho

Figura 15. Efecto de la dihidrotestosterona en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho.

Figura 16. Efecto de los esteroides sexuales en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra sensibilizadas con IgE

Figura 17. Efecto de los esteroides sexuales en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas macho estimuladas con IgE

ÍNDICE DE CUADROS

1. Principales mediadores químicos liberados por las células cebadas
2. Prevalencia de enfermedades alérgicas en la Ciudad de México

1. RESUMEN

La comunicación bidireccional entre los sistemas nervioso central, endocrino y el inmune tiene una función esencial en el organismo. Las alteraciones en esta comunicación producen la pérdida de la homeostasis, originando diversas patologías como procesos inflamatorios, autoinmunes, metabólicos y psiquiátricos. Los mensajeros que participan en la comunicación neuro-inmuno-endocrina son hormonas, neuropéptidos y citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias sintetizados por las células de los tres sistemas. Estos mensajeros actúan vía receptores, produciendo activación o inhibición de la respuesta inmune innata y adaptativa, así como del sistema nervioso y endocrino.

Las hormonas sexuales tienen un papel importante en la interacción sistema endocrino-sistema inmune, a través de sus efectos en las funciones de las células de este último. Una célula importante del sistema inmune es la célula cebada, ya que participa en la defensa innata, pero también es una de las principales células efectoras de las respuestas patológicas mediadas por IgE, como son las alergias. Interessantemente, la prevalencia de enfermedades alérgicas es mayor en mujeres, lo que sugiere la participación de las hormonas sexuales en el desarrollo de estas patologías. En este contexto, estudios previos han demostrado que las hormonas sexuales tienen efectos en la secreción de mediadores, biológicamente importantes, por las células cebadas.

En este estudio analizamos el efecto de los esteroides sexuales estradiol, progesterona, testosterona y DHT en la activación de células cebadas provenientes de ratas macho y hembra, para observar si existen diferencias en la respuesta de las células cebadas asociadas al sexo, ya que en estudios previos no se ha descrito el efecto de los esteroides sexuales en células cebadas de especies de diferentes sexos.

El efecto de las hormonas sexuales en la activación de las células cebadas, se analizó mediante la liberación de histamina de células cebadas estimuladas con diferentes concentraciones de hormonas, de manera directa o en presencia del secretagogo sustancia P. Observamos que los esteroides sexuales aumentaron significativamente la liberación

de histamina en células cebadas de ratas hembras mientras que en células de machos no tuvieron ningún efecto en la liberación de histamina. Esto muestra que existe una diferencia dependiente del sexo en la respuesta de las células cebadas y esta podría ser una de las razones por las que existe una mayor prevalencia de enfermedades alérgicas en mujeres. Interesantemente, cuando la liberación de histamina fue inducida por sustancia P los esteroides sexuales tuvieron un efecto inhibitorio en la liberación de histamina únicamente en células cebadas de ratas hembra pero no en ratas macho.

Dado que, la respuesta de las células cebadas durante las reacciones alérgicas puede ser influenciada por el nivel de expresión del receptor para la IgE, el FcεRI, en este estudio analizamos el posible efecto de los esteroides sexuales en la expresión de este receptor. El aumento en la expresión del FcεRI en la célula cebada es funcionalmente importante, ya que a mayor número de receptores mayor será la sensibilidad y la intensidad de la respuesta alérgica. Nuestros resultados muestran que los esteroides sexuales no tienen ningún efecto en la expresión del receptor FcεRI en células cebadas, sin importar si provenían de ratas hembra o macho. Lo anterior ocurrió con todos los esteroides sexuales analizados de forma directa o en células sensibilizadas con IgE.

Por lo anterior este estudio muestra que el efecto de los esteroides sexuales en la activación de las células cebadas mediante la liberación de histamina es dependiente del sexo, y que la expresión del receptor FcεRI no se ve afectada por estos mismos esteroides.

2. INTRODUCCIÓN

Los esteroides sexuales, progesterona, testosterona, dihidrotestosterona y estradiol además de regular funciones fisiológicas en la reproducción de los mamíferos, también regulan la respuesta inmunológica (Lau *et al.*, 2009). La presencia de receptores a

esteroides sexuales en células del sistema inmune indica que dichas hormonas ejercen sus efectos mediante la unión a estos receptores (Hernández *et al.*, 2011). Un tipo de célula que es parte importante del sistema inmune innato es la célula cebada. Las células cebadas residen en la mayoría de los tejidos, participan en la respuesta inmune innata y también son células efectoras en las respuestas patológicas mediadas por la inmunoglobulina E (IgE), como la alergia (Kumar y Sharma, 2010).

Las células cebadas participan en las reacciones alérgicas mediante la unión de su receptor de superficie de alta afinidad para la IgE a la fracción (FcεRI del antígeno) provocando la activación y la liberación inmediata de mediadores inflamatorios, responsables de los síntomas de la alergia (Galli y Tsai, 2010). La expresión del FcεRI en células cebadas es regulada por factores extracelulares, los cuales la aumentan, tales como la IgE y la Proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP 1 alfa), o la disminuyen como es el caso de la dexametasona (Yamaguchi *et al.*, 1997, 2001).

En enfermedades alérgicas se ha observado que existen diferencias en la frecuencia asociadas al sexo. Por ejemplo: el asma, la anafilaxia, la urticaria crónica y la alergia a la comida, son patologías que se presentan con mayor frecuencia en mujeres que en hombres. Estudios epidemiológicos indican que las hormonas sexuales contribuyen a esta diferencia (De Oliveira *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Kasperska-Zajac, 2010). Las hormonas sexuales influyen en el desarrollo de la respuesta alérgica, debido a sus efectos en las funciones de las células cebadas. Específicamente, los estrógenos son capaces de aumentar la activación de estas células, mientras que los andrógenos pueden inhibirlos. Los efectos de estrógenos, progesterona y andrógenos en las células cebadas son mediados por la interacción con sus receptores presentes en estas células (Revisado en Muñoz-Cruz *et al.*, 2011).

Debido a que las células cebadas están involucradas en varias enfermedades, las que en su gran mayoría afectan a mujeres, es necesaria una mejor comprensión de la influencia

de las hormonas sexuales en la función de las células cebadas, con el fin de generar nuevos enfoques terapéuticos

3. MARCO TEÓRICO

Los sistemas inmune, nervioso y endocrino son componentes esenciales en la fisiología de los mamíferos. Cada uno de ellos desarrollan diferentes funciones en la regulación de la homeostasis; el inmune participa en la defensa del organismo hacia agentes infecciosos, y el nervioso y endócrino en la regulación del metabolismo y otras actividades fisiológicas como la reproducción, y cambios propios de la pubertad. Diversos estudios han demostrado una colaboración activa y dinámica entre estos dos sistemas (Besedovski y Del Rey, 1996). Inicialmente se pensaba que el sistema inmune era autorregulado casi en su totalidad; sin embargo, ahora se sabe que el sistema inmune interactúa directa y bidireccionalmente con el sistema neuro-endócrino (Hernández *et al.*, 2011).

Esta comunicación bidireccional es posible porque estos sistemas comparten un “lenguaje químico” (Figura 1), que resulta de un intercambio de ligandos comunes (hormonas, neurotransmisores, péptidos y citocinas) y sus receptores específicos (Gaillard, 2003). Una comunicación neuro-inmuno-endócrina eficiente implica la existencia de vías aferentes y eferentes, que constituyen un sistema complejo de retroalimentación, y cuando se producen alteraciones en esta red se desencadenan patologías que involucran a los diferentes componentes de la misma. La interacción neuro-inmuno-endócrina es muy compleja, por lo que además de los diferentes factores inmunes implicados en la regulación de la red neuro-inmuno-endócrina, los esteroides sexuales asociados al género pueden ser un factor importante en el desarrollo de diversas patologías (De León y Montor, 2006).

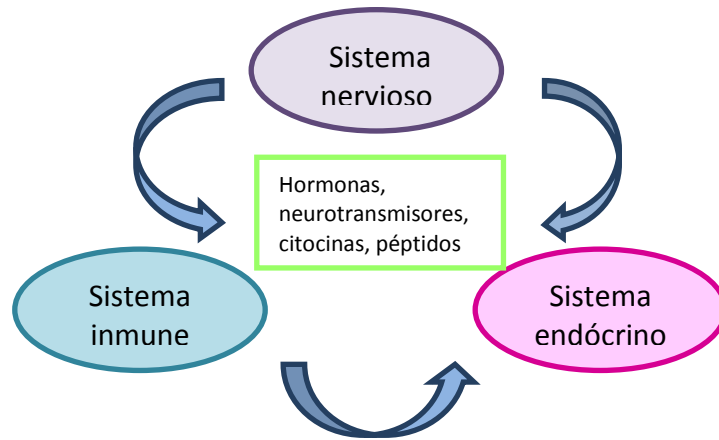


Figura 1. Comunicación neuro- inmuno- endócrina

El sistema inmune de los vertebrados ha evolucionado en dos sistemas principales de respuesta, diseñados para la defensa contra organismos infecciosos y otros agentes dañinos. El primero, denominado inmunidad innata, es la respuesta rápida y poco específica, que está diseñada para detener o eliminar patógenos activamente. La segunda respuesta es la inmunidad adaptativa es una respuesta lenta y específica, que se desarrolla en un período que va de días a semanas, resultando en una memoria inmunológica de vida larga contra el patógeno invasor (Iwasaki *et al.*, 2010).

3.1 Célula cebada

La célula cebada, descrita por primera vez por Paul Ehrlich en 1872, es una célula integral para la respuesta innata y para el desarrollo de la respuesta adaptativa ;. se origina a partir de progenitores hematopoyéticos pluripotentes derivados de la médula ósea, que expresan CD34 y c-kit (CD117), que al recibir señales mediante sus moléculas de adhesión y receptores, entra en la circulación para migrar hacia los tejidos (Wasiuk *et al.*, 2008), donde se diferencia y madura por la influencia del factor de células progenitoras (SCF), (Kalesnikoff, 2008; Soman y Ashley, 2010). El SCF es el mayor quimioatrayente de células cebadas y sus progenitores, también ayuda a la adhesión célula-célula, a la adhesión substrato-célula, facilita la proliferación y mantiene la

sobrevivencia y diferenciación (Okayama y Kawakami, 2006; Puxeddu *et al.*, 2003). La maduración de las células cebadas también está regulada por citocinas como la interleucina 3 (IL-3) y la interleucina 9 (IL-9) (Theoharides *et al.*, 2007; Jamur *et al.*, 2011).

Las células cebadas son células de vida larga, capaces de sobrevivir por meses o años y pueden proliferar en respuesta a señales apropiadas. Las células cebadas maduras tienen una morfología en común, poseen prominentes gránulos secretores en su citoplasma (Soman y Ashley, 2010), los cuales contienen mediadores preformados, entre los que se encuentran la histamina, heparina, triptasa, quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G, serotonina, hidrolasa ácida, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Además, estas células en respuesta a un estímulo adecuado sintetizan de novo, derivados del ácido araquidónico: prostaglandinas y leucotrienos; y una variedad de citocinas (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16, IL-25), así como el factor de crecimiento tumoral beta (TGF β), el SCF e interferón gama (IFN γ) (Puxeddu, *et al.*, 2003) (Cuadro 1).

Las células cebadas representan una población muy heterogénea en un mismo organismo. En el ratón se han descrito dos tipos de células cebadas y aparentemente también se encuentran en el hombre. En el ratón, se clasifican con base en el tejido en el que residen como células cebadas de mucosas y células cebadas de tejido conectivo, ambos tipos de células difieren en el contenido de sus gránulos y en la respuesta que desarrollan ante un estímulo externo (Shanahan, 1984). En humanos, las células cebadas se clasifican en dos subpoblaciones que se distinguen por su contenido de proteasas neutras. Estas células son designadas MC_{TC} por su contenido de triptasa y quimasa,, las que solo contienen triptasa se denominan MC_T (Metcalf *et al.*, 1997). Las MC_T tienen características similares a las células cebadas de mucosa de rata, mientras que las MC_{TC} tienen características de células de tejido conectivo de rata. Además, estas dos subpoblaciones presentan selectividad en las citocinas que producen. Sin embargo, la distribución en humanos no es tan clara como en roedores y la mayoría de los tejidos tienen poblaciones mixtas de células cebadas (Vliagoftis y Befus, 2005).

Las células cebadas se localizan en mayor número en la periferia de vasos sanguíneos y en vasos linfáticos en el tejido conectivo, también pueden ser encontradas en sitios adyacentes a nervios periféricos, así como en los órganos linfoides secundarios y en el sistema nervioso central. Son abundantes en áreas expuestas al ambiente externo tales como la piel y mucosas del tracto genitourinario, gastrointestinal y respiratorio (Abraham y Malaviya, 1997, Wasiuk *et al.*, 2008), también se encuentran en el timo y en la lengua (Yong *et al.*, 1997).

Cuadro 1. Principales mediadores químicos liberados por las células cebadas (Tomado de Marshall, 2004).

Preformados y almacenados en sus gránulos	
Mediador	Función
Aminas biogénicas: Histamina Serotonina (5-hidroxitriptamina) Dopamina	Vasodilatación, angiogénesis, regulación de la RI Vasoconstricción, inflamación, dolor
Proteoglicanos: Heparina Condroitin sulfato	Angiogénesis, regula función celular Componente del tejido conectivo, anti-inflamatorio
Enzimas: Triptasa, quimasa, MMP NOS Carboxipeptidasa	Remodelación de tejido, angiogénesis, inflamación. Producción de óxido nítrico Procesamiento de péptidos
Citocinas: TNF- α IL-4 TGF- β	Recluta neutrófilos, macrófagos, activación de CD, T. Síntesis de IgE, activación de células B, Th2 Regulación
Quimiocinas: IL-8, MCP-1, MCP-3 MCP-4, RANTES	Quimioatracción e infiltración tisular de leucocitos.
Otros: VEGF Substancia P Catelicidina LL-37	Neurovascularización, angiogénesis, vasodilatación Inflamación, dolor, activación de células cebadas Antimicrobiano
Derivados de lípidos de membrana	
Prostaglandinas: PGD2	Broncoconstricción, incrementa permeabilidad vascular, regula la producción de citocinas proinflamatorias, dolor.
	PGE2
Leucotrienos: LTB4	Acción quimiotáctica para neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfocitos efectoras CD4+ y CF8+
	LTC4
Factor activador de plaquetas (PAF)	Vasoconstricción, dolor. Activación de plaquetas, vasodilatación, angiogénesis, inflamación.
Producción de citocinas y quimiocinas (síntesis de novo)	
Citocinas: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, INF- α/β IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 IL-12, IFN- γ IL-10, TGF- β	Proinflamatorias Th2 Th1 Reguladoras
Quimiocinas: CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11	Atracción de células efectoras, incluyendo células dendríticas, regulación de la respuesta inmune

CCL, ligando de quimiocina; FGF, factor de crecimiento fibroblástico, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos; IFN, interferón, IL, interleucina; LIF, factor inhibidor de leucocitos; LTB4, leucotrieno B4; LTC4, leucotrieno C4; PGD2, prostaglandina D2; PGE2, prostaglandina E2, TGF, factor transformante del crecimiento, TNF, factor de necrosis tumoral; VEGF, factor de crecimiento del endotelial vascular

3.2 Participación de las células cebadas en la alergia

Las células cebadas tienen un papel fundamental en las reacciones alérgicas, debido a la presencia de receptores de alta afinidad para la inmunoglobulina E (FcεRI) en su membrana plasmática. (Metcalf *et al.*, 1997).

El desarrollo de una reacción alérgica tiene lugar en varias etapas similares a las de una reacción inmune normal (Figura 2). En primer lugar, se produce la entrada del alérgeno al organismo y la producción de IgE específica para éste. La IgE se fija en la superficie de las células cebadas a través del receptor de alta afinidad, FcεRI. Posteriormente, el alérgeno reacciona con la IgE unida a la superficie de las células cebadas, dando lugar al entrecruzamiento de los receptores y por tanto la transducción de señales intracelulares, que inducen la degranulación de las células cebadas, con la liberación de mediadores de inflamación, responsables de la sintomatología de las reacciones alérgicas (Prussin y Metcalfe, 2006).

La activación de las células cebadas vía agregación del FcεRI, por la unión de un antígeno bi o multivalente a la IgE, induce una respuesta compleja. Esta respuesta incluye la liberación inmediata de histamina, heparina, proteasas y algunas citocinas contenidas en sus gránulos; la secreción (en minutos) de derivados de lípidos de membrana, sintetizados de novo, entre los que se incluyen leucotrienos y prostaglandinas; y la producción, con una cinética de tiempo prolongada, de diversas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. El entrecruzamiento de una pequeña fracción del receptor FcεRI es suficiente para detonar la activación y liberación de mediadores (Kawakami y Galli, 2002). Sin embargo, el grado con que las células cebadas secretan diferentes tipos de mediadores, puede variar de acuerdo a la intensidad de la señal de activación que puede ser positiva o negativamente regulada por exposición a ligandos de otros receptores, de los muchos que expresa esta célula (Rivera y Gilfillan, 2006).

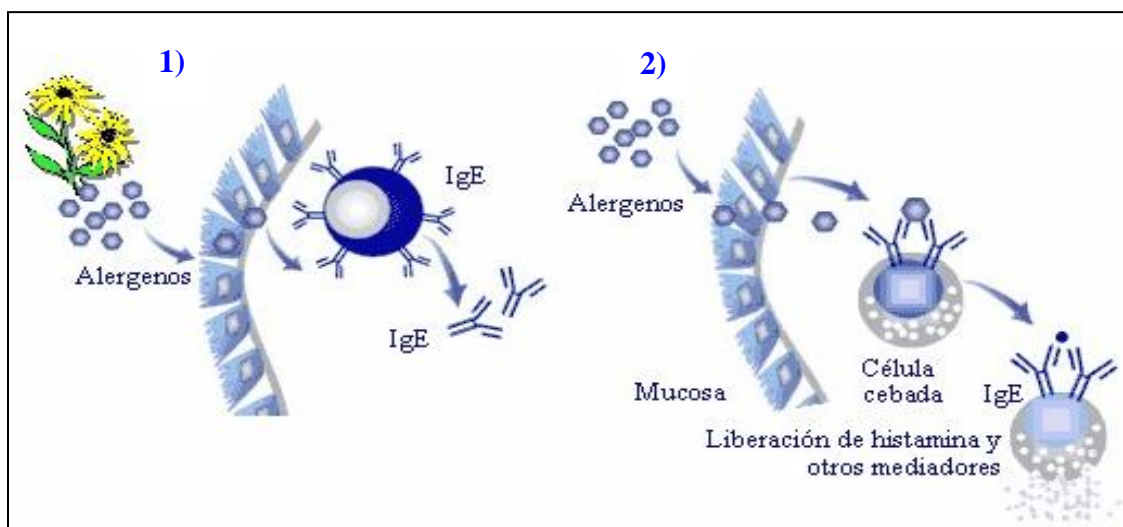


Figura2. Participación de las células cebadas en la respuesta alérgica. La reacción alérgica se inicia con la sensibilización al alérgeno y la producción de IgE. En una segunda exposición, el alérgeno reacciona con la IgE unida a la célula cebada, lo que produce la activación y la inmediata liberación de sus mediadores químicos (Tomado del <http://www.inmunologiaenlinea.es>).

3.3 Prevalencia mundial de enfermedades alérgicas

De acuerdo a la Organización Mundial de Alergia (2008), la prevalencia mundial de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE, se ha incrementado en las últimas décadas. La predisposición genética y diversos factores ambientales juegan un papel importante en la manifestación de las alergias. Se estima que el 20% de la población mundial sufre alguna enfermedad mediada por IgE, tal como asma, rinitis, dermatitis atópica, etc.

En la ciudad de México, la prevalencia de enfermedades alérgicas es del 42.6%, siendo la rinitis alérgica la más común (**Cuadro 2**). Debido a la alta prevalencia y a los gastos que derivan de las enfermedades alérgicas, éstas deben considerarse un problema de salud pública en la ciudad de México (López-Pérez *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Prevalencia de enfermedades alérgicas en la Ciudad de México (Tomado de López-Pérez *et al.*, 2009).

Enfermedad alérgica	Prevalencia n=4,742	Frecuencia en el caso índice
Asma	14.9%	35.1%
Rinitis alérgica	19.6%	46.1%
Dermatitis atópica	18.7%	43.9%
Conjuntivitis alérgica	17.9%	42%
Urticaria	3.2%	7.5%

En diversos estudios clínicos y epidemiológicos se han mostrado que existen diferencias asociadas al género en la prevalencia de enfermedades alérgicas (López-Pérez *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2008).

Lo anterior sugiere la participación de las hormonas esteroides sexuales en el desarrollo de dichas enfermedades (De León y Montor, 2006). Mujeres adultas tienden a desarrollar enfermedades como urticaria, angioedema y anafilaxis con mayor frecuencia que hombres, sin embargo la diferencia de géneros es revertida en niños antes de la pubertad (Chen *et al.*, 2008; Kasperska y Brzoza, 2008). Por otra parte, estudios epidemiológicos han sugerido que las oscilaciones en las concentraciones de los esteroides sexuales en las mujeres exacerban los síntomas del asma (De Oliveira *et al.*, 2007).

3.4 Factores externos que modulan la respuesta alérgica

La respuesta de las células cebadas durante las reacciones alérgicas, puede ser influenciada por el nivel de expresión del receptor FcεRI. Estas células expresan un gran número de receptores FcεRI de manera constitutiva. Sin embargo, la expresión del FcεRI puede verse afectada por factores externos los cuales pueden aumentar su expresión, tales como la concentración de IgE en el microambiente y la (Proteína inflamatoria de macrófagos I alfa) MIP 1 alfa (Yamaguchi *et al.*, 1997), o disminuirla como es el caso de la dexametasona (Yamaguchi *et al.*, 2001). Además, en personas alérgicas, existe una

correlación positiva entre la concentración de IgE sérica y el nivel de expresión del FcεRI en las células cebadas. El aumento en la expresión del FcεRI en la célula cebada es funcionalmente importante, ya que a mayor número de receptores mayor será la sensibilidad y la intensidad de la respuesta alérgica (Brazis *et al.*, 2001).

Interesantemente, los esteroides sexuales pueden afectar la respuesta de las células cebadas al inducir o inhibir la liberación selectiva de sus mediadores químicos y por consecuencia el desarrollo de patologías en las cuales participan; por ejemplo, las alergias. Los efectos de los esteroides sexuales sobre las células cebadas son mediados por la interacción con sus receptores, ya que las células cebadas expresan constitutivamente receptores para progesterona (P₄), testosterona y 17 β-estradiol (E₂) (Revisado en Muñoz-Cruz *et al.*, 2011).

3.5 Efectos de las hormonas esteroides sexuales en las células cebadas

Progestinas

Una de las progestinas más importantes es la Progesterona (P₄), que es una hormona clave en el establecimiento y mantenimiento del embarazo. Se sabe que este esteroide contribuye, mediante diversas acciones, a la supresión de la inmunidad materna contra el feto (De León y Montor, 2006). Además de sus funciones en la reproducción, esta hormona influye en la liberación de mediadores químicos de las células cebadas. El receptor a progesterona se ha identificado en células cebadas de la mucosa nasal (Zhao *et al.*, 2001). En células cebadas de peritoneo de rata la P₄ es capaz de inhibir la liberación de histamina de forma directa (Vasiadi *et al.*, 2006). Por otra parte se mostró que la progesterona produjo una considerable degranulación en las células cebadas (Gibbons y Chang, 1972). Otros experimentos en ratas confirman que la P₄ suprime la liberación de histamina, pero potencia la estimulación por IgE (Cocchiara *et al.*, 1990). Belot y colaboradores (2007) mostraron que concentraciones fisiológicas de P₄ *in vitro* reduce un 50% de la proliferación espontánea de células cebadas de humano en comparación a las células cultivadas sin hormona.

Andrógenos

La testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) son los dos andrógenos sexuales biológicamente más importantes, porque además de su participación en la función reproductiva tienen una participación importante en la respuesta inmune (Bouman *et al.*, 2005). la expresión del receptor de andrógenos en células cebadas humanas aisladas de piel, así como en las líneas celulares HMC-1 y LAD2, se describió recientemente (Chen *et al.*, 2010).

Se ha observado que en células cebadas de peritoneo de rata macho, la testosterona inhibe la secreción de histamina inducida por el compuesto 48/80 (un activador de estas células), pero por sí sola no tiene ningún efecto en la liberación de histamina (Vliagoftis *et al.*, 1992).

Respecto a la dihidrotestosterona a la fecha no existen estudios que indiquen su efecto en la degranulación de las células cebadas.

Estrógenos

Los estrógenos son producidos principalmente en el ovario y de las distintas formas que existen, el 17 β -estradiol es la forma circulante más común. Además de su participación importante en las funciones reproductivas, los estrógenos regulan diversas acciones celulares como proliferación, morfogénesis, diferenciación y apoptosis (Lorenzo, 2003; De León y Montor, 2006).

Los estrógenos son capaces de regular las funciones de las células cebadas. el estradiol aumenta la secreción de histamina en células cebadas de peritoneo de rata macho inducida por el compuesto 48/80 de forma dosis dependiente, (Vliagoftis *et al.*, 1992) mientras que por sí solo el estradiol no tiene ningún efecto en la liberación de este mediador (Vliagoftis *et al.*, 1992) Otros experimentos en ratas confirman un efecto estimulador del E2 en la activación de las células cebadas mediante la liberación de histamina y la sensibilización alérgica. (Cocchiara *et al.*, 1990). (Chen *et al.*, 2009; Zaitzu *et al.*, 2007). En células cebadas peritoneales de rata estimuladas con E₂ aumenta

la secreción de histamina y serotonina de manera dosis dependiente (Vliagoftis *et al.*, 1992).

El receptor de estrógenos alpha ($ER\alpha$) se expresa de manera constitutiva en células cebadas humanas, de vejiga, arteria (Pang *et al.*, 1995; Nicovani y Rudolph, 2002), nasales (Zhao *et al.*, 2001; Shirasaki *et al.*, 2004) y en dos líneas celulares humanas (HMC-1) y (RBL-2H3), así como en células cebadas de médula ósea (BMMC) (Zaitzu *et al.*, 2007). En contraste, el receptor a estrógenos beta ($ER\beta$) no se ha encontrado expresado de forma constitutiva en células cebadas HMC-1, BMMC y RBL-2H3 (Zaitzu *et al.*, 2007).

El efecto de los esteroides sexuales en las células cebadas, es controversial, ya que algunos estudios han mostrado que los esteroides sexuales como el estradiol y la progesterona por si solos tienen un efecto activador de la degranulación de estas células incluyendo la secreción de sus mediadores químicos (Cocchiara *et al.*, 1990; Gibbons y Chang, 1972) mientras que otros muestran que el estradiol y la testosterona por si solos no tienen ningún efecto (Vliagoftis *et al.*, 1992) y para progesterona se ha mostrado un efecto inhibitorio en la degranulación de las células cebadas (Vasiadi *et al.*, 2006). Estas diferencias pueden ser debidas a las diferentes condiciones utilizadas en cada estudio, como son: la concentración, el tipo de esteroide sexual, el tipo de estudio, *in vivo* o *in vitro*, y el género de los animales utilizados.

Por lo anterior, en este estudio se analizó el efecto *in vitro* de los esteroides sexuales (estradiol, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona) en la activación de células cebadas, provenientes de peritoneo de ratas hembra y macho, en un rango amplio de concentraciones (fisiológicas y farmacológicas). Se observó el efecto de los diferentes esteroides sexuales en la liberación de histamina (activación) y también en la expresión del receptor para IgE ($Fc\epsilon RI$), factores importantes en la respuesta alérgica.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la importancia que tienen las células cebadas en procesos patológicos como son las alergias y la influencia que los esteroides sexuales tienen en la función de estas células, es necesario realizar estudios para poder entender cómo y de qué manera los esteroides sexuales afectan la función de estas células.

5. HIPÓTESIS

Las hormonas esteroides sexuales: progesterona, testosterona, dihidrotestosterona y 17 β -estradiol, afectarán de forma dosis dependiente la liberación de histamina y la expresión del receptor Fc ϵ RI de las células cebadas, mostrando una diferencia entre sexos *in vitro*.

6. OBJETIVO GENERAL

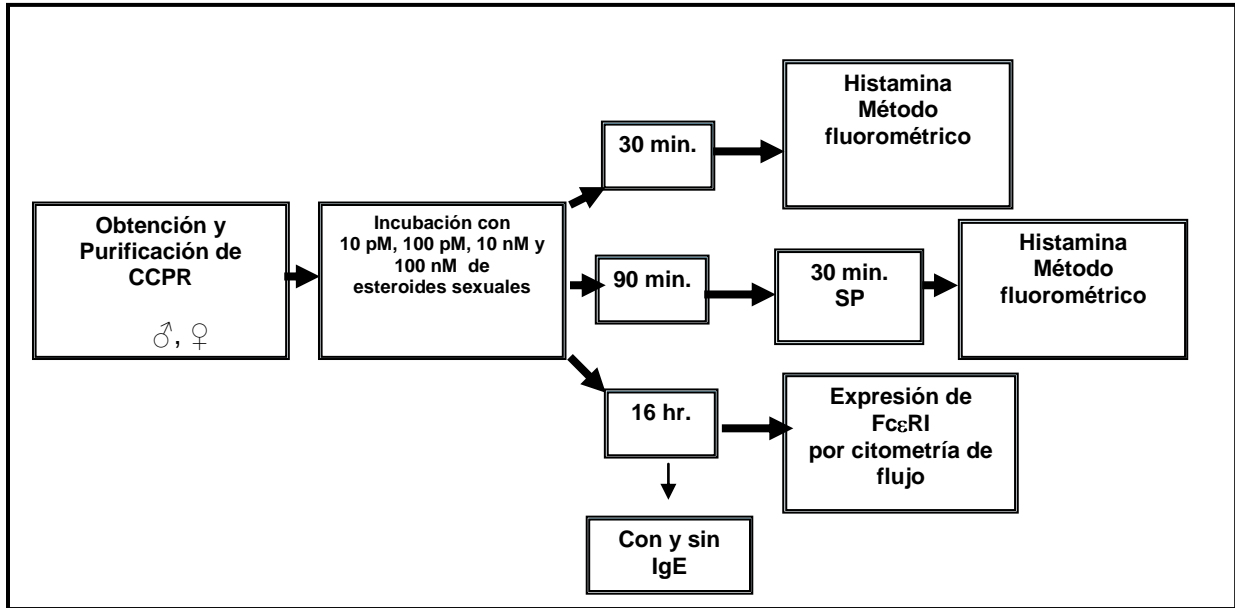
Analizar el efecto de la progesterona, la testosterona, la dihidrotestosterona y del 17 β -estradiol en la expresión del receptor para IgE (Fc ϵ RI) y en la liberación de histamina de células cebadas extraídas de peritoneo de ratas macho y hembra.

6.1 Objetivos particulares

- Evaluar la activación de células cebadas de peritoneo de ratas hembra o macho por estimulación con progesterona, testosterona, dihidrotestosterona y 17 β -estradiol mediante la liberación de histamina.
- Analizar el efecto de los esteroides sexuales en la liberación de histamina inducida por sustancia P en células cebadas de peritoneo de ratas hembra o macho adultos.
- Analizar el efecto de los esteroides sexuales en la expresión del receptor Fc ϵ RI mediado por IgE y de forma independiente en células cebadas de peritoneo de rata hembra o macho

7. MATERIAL Y METODOS

Esquema general de trabajo.



7.1 Obtención y purificación de las células cebadas de peritoneo de rata (CCPR)

Las células cebadas se obtuvieron de ratas hembra y macho de la cepa Sprague Dawley mediante un lavado del peritoneo (después de sacrificar a los animales), este procedimiento se realizó para obtener las células que fueron utilizadas en cada experimento, por triplicado, usando una rata macho y una rata hembra por experimento. Para obtener las células cebadas fue necesario sacrificar a los animales en una cámara de CO₂, se inyectaron 20 mL de regulador HEPES Tyrode's pH 7.4 (N- 2 -N-2-acido etanosulfónico, D-glucosa, NaCl, CaCl₂, KCl, BSA 0.1 %, NaH₂PO₄) (Sigma Co., USA), en la cavidad peritoneal seguido por un suave masaje y la recuperación de las células peritoneales con una pipeta de transferencia y colocadas en un tubo frío de polipropileno. Las células cebadas se purificaron en un gradiente discontinuo de Percoll el cual consiste en una capa inferior de Percoll al 80% (Sigma Co., USA) y una capa superior al 30%. Este gradiente se centrifugó a 1600 rpm durante 20 minutos (Lee *et al.*, 1985) para poder

separar las células cebadas de otros tipos celulares como macrófagos y linfocitos. Se obtuvieron células cebadas con más de un 95% de pureza al teñirse con azul de toluidina (Figura 3). La viabilidad celular requerida debió ser mayor a 95% la cual se analizó por tinción con azul de tripan.

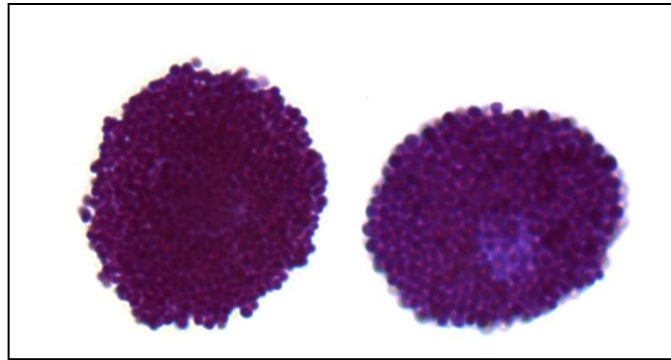


Figura 3. Células cebadas teñidas con azul de toluidina al 0.1%. Se muestran CCPR, después de la purificación en un gradiente discontinuo de Percoll. Se observan los gránulos metacromáticos de color púrpura, que llenan el citoplasma de las células. 100 X.

7.2 Liberación de histamina de CCPR

La liberación de histamina es un marcador de activación el cual permite observar si las células cebadas responden a estímulos, ya que al activarse producen la rápida liberación de histamina. A los controles positivos se les adicionó 10 μ M de sustancia P (SP, un neuropéptido activador de células cebadas (Nieber *et al.*, 1991) (Sigma Co., EU). Las células cebadas a las cuales únicamente se les adicionó regulador Hapes-Tyrode se usaron como control para analizar la liberación basal de histamina.

El efecto de la progesterona, testosterona, DHT y 17 β -estradiol, en células cebadas se estudió examinando la liberación de histamina inducida por la incubación directa de las CCPR con cada una de las hormonas. Este experimento se realizó en ratas hembra y macho para observar si existían diferencias en la respuesta asociadas al sexo.

En este experimento se colocaron 25, 000 CCPR en tubos eppendorf y se incubaron por separado con P₄, testosterona, DHT y E₂, a diferentes concentraciones (10 pM, 100 pM, 10 nM y 100 nM), durante 30 minutos a 37°C. Las concentraciones utilizadas para los

experimentos están dentro del rango de las concentraciones descritas en la literatura, para algunos de los esteroides sexuales, que tienen un efecto en la degranulación de células cebadas. Transcurrido el tiempo de activación, los sobrenadantes se separaron de las pastillas celulares por centrifugación. La cantidad de histamina presente en los sobrenadantes y en las pastillas correspondientes, se cuantificó mediante una reacción con o-ftaldialdehído (1.3 mg/mL en metanol grado fluorométrico) (Sigma Co., EU), que al unirse a la histamina forma un producto fluorescente estable a pH ácido. Las lecturas se realizaron en un espectrofluorómetro (Fluoroskan II, Lab. System, Finlandia), con filtros de emisión de 455 nm y excitación de 345 nm (Siraganian, 1974). Cada experimento se realizó por triplicado.

Los porcentajes de histamina liberada se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de histamina liberada} = \frac{\text{histamina en el sobrenadante}}{(\text{histamina en el sobrenadante} + \text{histamina en pastilla})} \times 100$$

7.3 Liberación de histamina de CCPR pretratadas con hormonas sexuales y estimuladas con Sustancia P

Las células cebadas pueden ser activadas por estímulos inmunológicos y no inmunológicos, entre los estímulos no inmunológicos está la sustancia P, un neuropéptido que activa a las células cebadas y que ha sido implicado en una variedad de patologías (Church *et al.*, 1989; Goezl *et al.*, 1990; Nieber *et al.*, 1991). Por lo tanto, en este experimento evaluamos el efecto que los esteroides sexuales tienen en la liberación de histamina inducida por este compuesto.

Para cada ensayo se incubaron 25,000 células cebadas con cada esteroide durante 90 minutos a 37°C, a las concentraciones 10 pM, 100 pM, 10 nM y 100 nM. Transcurrido el tiempo se adicionó la sustancia P a una concentración de 10 µM en un volumen final de 200 µL, durante 30 min. Se cuantificó el porcentaje de histamina liberada, por el método

fluorométrico como se mencionó anteriormente. Cada experimento se realizó por triplicado.

7.4 Expresión del receptor FcεRI en CCPR estimuladas con esteroides sexuales

La respuesta de las células cebadas, puede ser influenciada por el nivel de expresión del receptor FcεRI sin embargo, la expresión de este receptor se puede modificar por factores externos los cuales pueden aumentar su expresión y con esto su sensibilidad e intensidad de respuesta. Por lo que, en este experimento se investigó si los esteroides sexuales tenían un efecto en la expresión del receptor FcεRI.

Para analizar el efecto de cada hormona esteroide sexual en la expresión del receptor FcεRI en las CCPR hembra y macho, estas se incubaron directamente con las distintas concentraciones de esas hormonas (10 pM, 100 pM, 10 nM y 100 nM), por separado, durante 16 horas y la expresión del receptor se analizó por citometría de flujo. Como controles se usaron células sin tratamiento: sin teñir, con anticuerpo secundario-FITC y con los 2 anticuerpos primario anti-FcεRI y secundario-FITC.

Se colocaron 50,000 células cebadas en tubos eppendorf y se estimularon con cada esteroide a las concentraciones ya mencionadas, durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron a 3,400 rpm por 5 minutos, para separar sobrenadantes de las pastillas. Después se incubaron con el anticuerpo anti FcεRI durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron con regulador de FACS por centrifugación a 3,000 rpm/3 minutos, para retirar el exceso de anticuerpo y el anticuerpo que no se unió. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (anti FcεRI-FITC) y se guardaron durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Las células se lavaron con regulador de FACS por centrifugación a 3,000 rpm durante 3 minutos, para retirar el excedente de anticuerpo. Se retiraron los sobrenadantes y se fijaron las células con paraformaldehído al 4%. Las

células se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta el momento de ser analizadas en el citómetro.

7.5 Expresión del receptor FcεRI en CCPR estimuladas con IgE y con esteroides sexuales

Dado que la expresión del receptor FcεRI en células cebadas aumenta en presencia de IgE *in vitro*, así como *in vivo* durante una sensibilización alérgica, investigamos la influencia que los esteroides sexuales pudieran tener en la expresión del receptor FcεRI en células cebadas sensibilizadas. Se analizó el efecto de los esteroides sexuales en la expresión del receptor FcεRI en las CCPR co-incubadas con una concentración saturante de IgE (5µg/ml) y con los esteroides a distintas concentraciones (10 pM, 100 pM, 10nM y 100 nM), cada uno por separado, durante 16 horas. Posteriormente, la expresión del receptor se analizó por citometría de flujo. Como controles se usaron células sin tratamiento: sin teñir, con anticuerpo secundario anti IgE-FITC, y con primario IgE y secundario anti IgE-FITC.

Se colocaron 50,000 células cebadas en tubos eppendorf y se incubaron durante 16 horas con cada uno de los esteroides sexuales a las concentraciones antes mencionadas, en presencia de IgE a una concentración de 5µg/mL. Pasado el tiempo de incubación las CCPR se centrifugaron a 3,400 rpm por 5 minutos, a las pastillas se les adicionó el anticuerpo secundario anti- IgE-FITC a una dilución 1:200 durante 30 minutos a 4° C en oscuridad. Transcurrido el tiempo se agregaron 500 µL de regulador de FACS y las células fueron centrifugadas durante 3 minutos a 3,000 rpm para quitar el anticuerpo secundario que no se haya pegado, después se fijaron las células con regulador de FACS y paraformaldehído al 4%. Las células se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta el momento de ser analizadas en el citómetro.

7.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, que permite analizar simultáneamente los efectos de dos factores (tratamiento y sexo), con la prueba de comparación de Bonferroni. Para lo anterior, se empleó el programa GraphPad Prism 5. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

8. RESULTADOS

8.1 Efecto directo de esteroides sexuales en la liberación de histamina en células cebadas de peritoneo de ratas macho y hembra.

La liberación basal en todos los experimentos fue igual o menor al 8% y la liberación inducida por la SP, fue de aproximadamente 30%. La liberación de histamina inducida por cada uno de los esteroides sexuales, en las CCP de ratas hembra y macho fue la siguiente:

Progesterona

La P₄ únicamente estimuló la liberación de histamina, de manera significativa, en las CCP de ratas hembra a las concentraciones 10 n y 100 nM. Mostraron un aumento dosis-dependiente en la liberación de histamina, con respecto a la liberada por las células sin estimular (Figura 4).

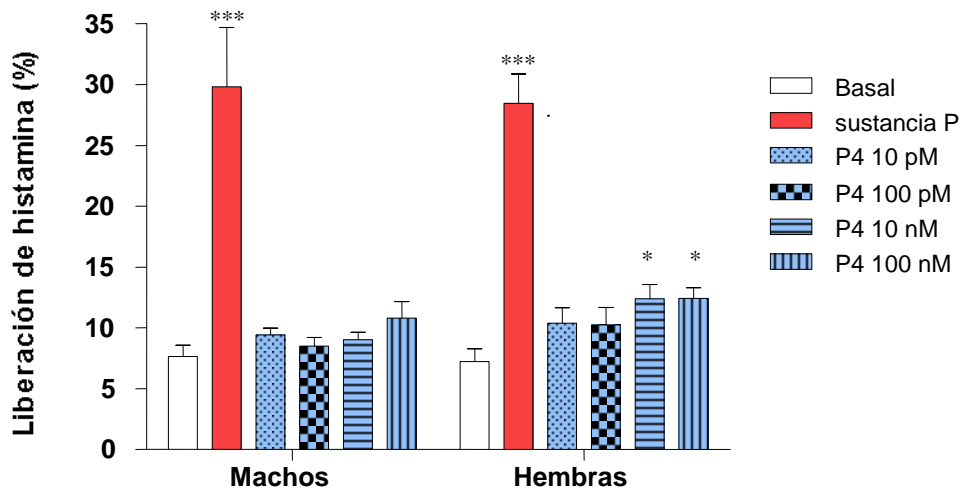


Figura 4. Efecto de la progesterona en la liberación de histamina en CCP de ratas macho y hembra. Las CCPR macho y hembra se incubaron con diferentes concentraciones de progesterona (P₄), durante 30 minutos y se analizó el porcentaje de histamina liberada. La liberación de histamina de células cebadas sin estímulo (Basal) y estimuladas con SP (10 μM), fueron incluidas como controles. Los valores son el promedio ± DS de tres experimentos independientes hechos por triplicado. *p<0.05, ***p<0.001 respecto a la liberación basal.

Testosterona

La testosterona provocó un aumento significativo en la liberación de histamina en CCP de ratas hembra con respecto a la liberación basal, a las concentraciones de 100 pM y 10 nM. En CCP de ratas macho no se observó efecto en la liberación de histamina, con respecto a la liberación basal, (Figura 5). Estos resultados demuestran que el aumento en la liberación de histamina, en células cebadas inducida por la testosterona, fue dependiente del sexo.

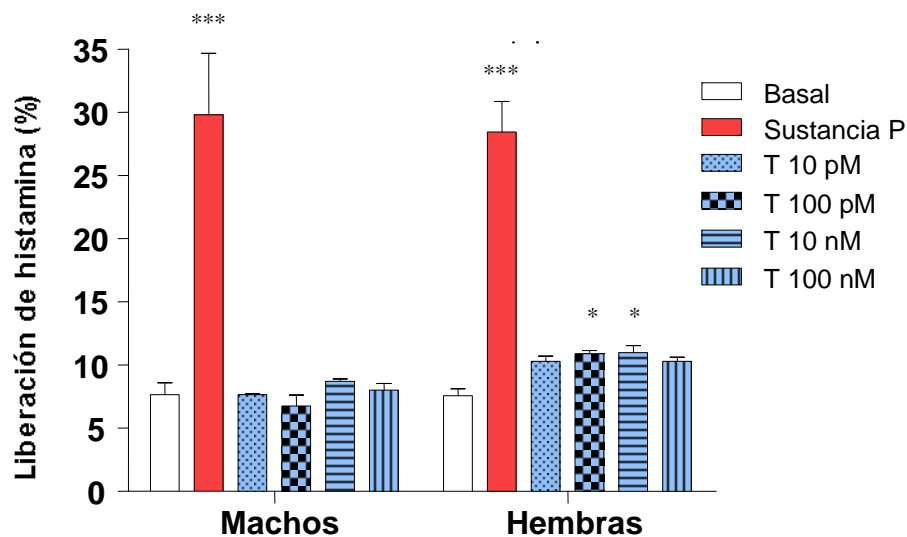


Figura 5. Efecto de la testosterona en la liberación de histamina en CCP de ratas hembra y macho. Las CCPR macho y hembra se incubaron con diferentes concentraciones de testosterona (T), durante 30 minutos y se analizó el porcentaje de histamina liberada. La liberación de histamina de células cebadas sin estímulo (Basal) y estimuladas con SP (10 μ M), fueron incluidas como controles. Los valores son el promedio \pm DS de tres experimentos independientes hechos por triplicado. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto al basal.

Dihidrotestosterona

La DHT a las concentraciones 10 y 100 nM aumentó la liberación de histamina en CCP de ratas hembra, con respecto a la liberación basal. Sin embargo, en CCP de ratas macho, la DHT no tuvo efecto en la liberación de histamina a ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 6).

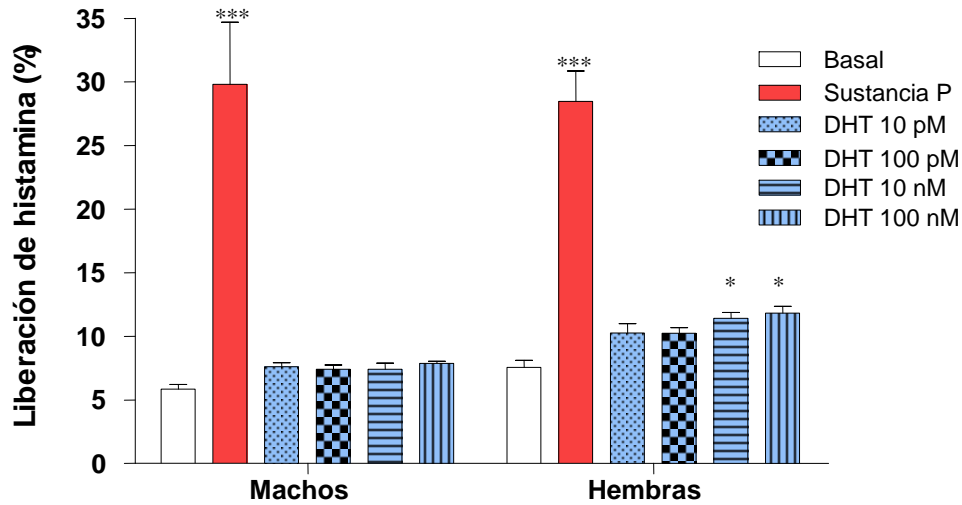


Figura 6. Efecto de la Dihidrotestosterona en la liberación de histamina en CCP de ratas macho y hembra. Las CCPR macho y hembra se incubaron con diferentes concentraciones de dihidrotestosterona (DHT), durante 30 minutos y se analizó el porcentaje de histamina liberada. La liberación de histamina de células cebadas sin estímulo (Basal) y estimuladas con SP (10 μ M), fueron incluidas como controles. Los valores son el promedio \pm DS de tres experimentos independientes hechos por triplicado. *** p <0.001 respecto a la liberación basal.

17 β -Estradiol

El E₂ no tuvo un efecto significativo en la liberación de histamina en CCP de ratas macho, a ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 7). Sin embargo, en CCP de ratas hembra a las concentraciones de 10 pM y 100 pM, aumentó la liberación de histamina de manera significativa, con respecto a la liberación basal.

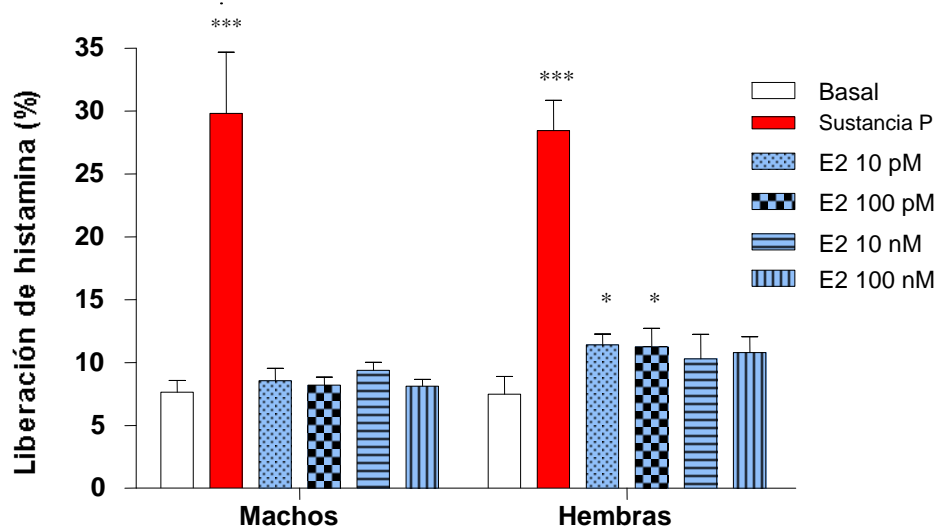


Figura 7. Efecto del estradiol en la liberación de histamina en CCP de ratas macho y hembra. Las CCPR macho y hembra se incubaron con diferentes concentraciones de estradiol (E2), durante 30 minutos y se analizó el porcentaje de histamina liberada. La liberación de histamina de células cebadas sin estímulo (Basal) y estimuladas con SP (10 μ M), fueron incluidas como controles. Los valores son el promedio \pm DS de tres experimentos independientes hechos por triplicado (*) $p < 0.05$ y (***) $p < 0.001$ respecto a la liberación basal.

8.2 Efecto de los esteroides sexuales en la liberación de histamina inducida por sustancia P, en CCPR hembra y macho

La liberación basal en todos los experimentos fue igual o menor al 8% y la liberación inducida por la SP por sí sola, fue de más o menos 30%. El efecto de cada uno de los esteroides en la liberación de histamina inducida por SP, en las CCP de ratas hembra y macho se muestra a continuación:

Efecto de la progesterona en la liberación de histamina inducida por sustancia P en CCP de rata hembra y macho.

En CCP de ratas hembra la P4 tuvo un efecto inhibitorio en la liberación de histamina, inducida por SP, a todas las concentraciones utilizadas. Por el contrario, en CCP de ratas macho la hormona no tuvo efecto en la liberación de histamina, inducida por SP, a ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 8).

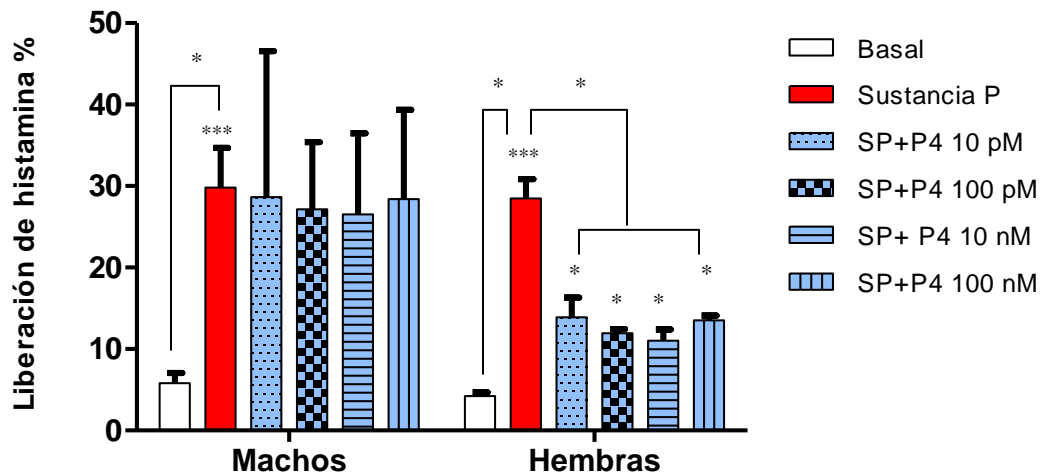


Figura 8. Efecto de la progesterona en la liberación de histamina inducida por sustancia P, en CCP de ratas macho y hembra. Las CCPR macho y hembra se preincubaron con diferentes concentraciones de P₄, durante 90 minutos y después se estimularon con SP durante 30 minutos en presencia de la hormona. Se analizó el porcentaje de histamina liberada. La liberación de histamina de células cebadas sin estímulo (Basal) y estimuladas solo con SP (10 μM), fueron incluidas como controles. Los valores son el promedio ± DS de tres experimentos independientes hechos por triplicado. (*) p < 0.05 y (***) p < 0.001 respecto a la liberación basal.

Efecto de la testosterona en la liberación de histamina inducida por sustancia P en CCP de ratas hembra y macho.

La liberación de histamina inducida por SP en CCPR hembra, fue inhibida de manera significativa por el pretratamiento con testosterona a todas las concentraciones utilizadas. Mientras que, en CCP de ratas macho el pretratamiento con la hormona no tuvo efecto en la liberación de histamina inducida por SP (Figura 9).

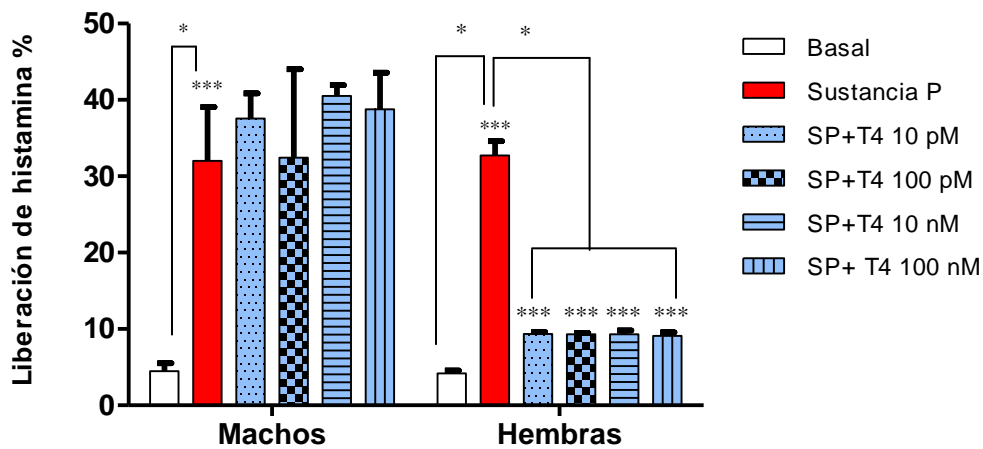


Figura 9. Efecto de la testosterona en la liberación de histamina inducida por sustancia P, en CCP de ratas macho y hembra. Las CCPR macho y hembra se preincubaron con diferentes concentraciones de T, durante 90 minutos y después se estimularon con SP durante 30 minutos en presencia de la hormona. Se analizó el porcentaje de histamina liberada. La liberación de histamina de células cebadas sin estímulo (Basal) y estimuladas solo con SP (10 μ M), fueron incluidas como controles. Los valores son el promedio \pm DS de tres experimentos independientes hechos por triplicado. (*) p < 0.05 y (***) p < 0.001 respecto a la liberación basal.

Efecto de la dihidrotestosterona (DHT) en la liberación de histamina inducida por sustancia P en CCPR hembra y macho.

La DHT tuvo un efecto similar al observado con la testosterona ya que esta inhibió significativamente la liberación de histamina inducida por SP, en CCP de ratas hembra a todas las concentraciones utilizadas. Mientras que, en CCP de ratas macho la DHT tuvo un efecto significativo al aumentar la liberación de histamina inducida por SP a las concentraciones de 10 pM y 10 nM (Figura 10).

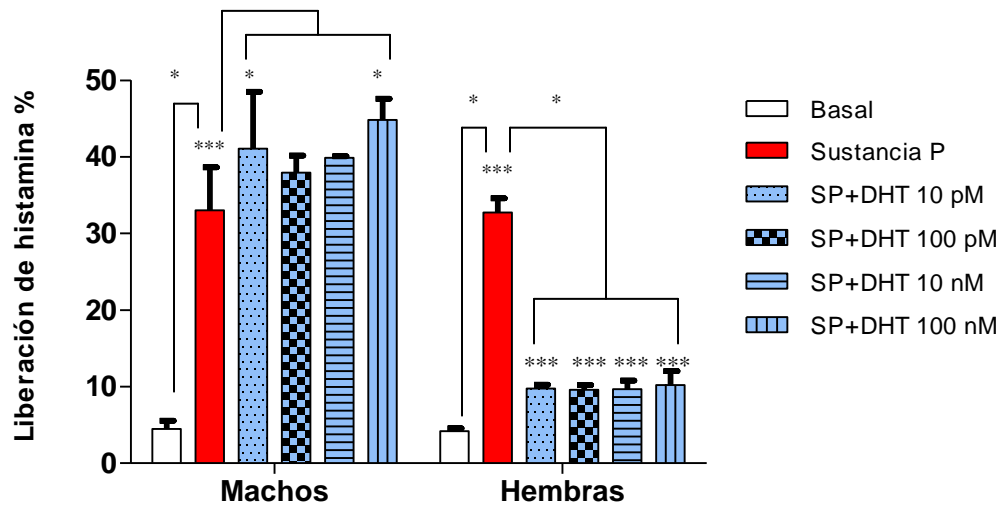


Figura 10. Efecto de la dihidrotestosterona (DHT) en la liberación de histamina inducida por sustancia P en CCP de ratas macho y hembra. Las CCPR macho y hembra se preincubaron con diferentes concentraciones de DHT, durante 90 minutos y después se estimularon con SP durante 30 minutos en presencia de la hormona. Se analizó el porcentaje de histamina liberada. La liberación de histamina de células cebadas sin estímulo (Basal) y estimuladas solo con SP (10 μ M), fueron incluidas como controles. Los valores son el promedio \pm DS de tres experimentos independientes hechos por triplicado. (*) p < 0.05 y (***) p < 0.001 respecto a la liberación basal.

Efecto del estradiol en la liberación de histamina inducida por sustancia P en CCP de ratas macho y hembra.

El E₂ no tuvo un efecto significativo en la liberación de histamina inducida por SP en CCP de ratas macho, a ninguna de las concentraciones utilizadas. Mientras que, en CCP de ratas hembra la hormona a las concentraciones de 10 pM, 100 pM y 10nM, inhibió de manera significativa la liberación de histamina inducida por SP (Figura 11).

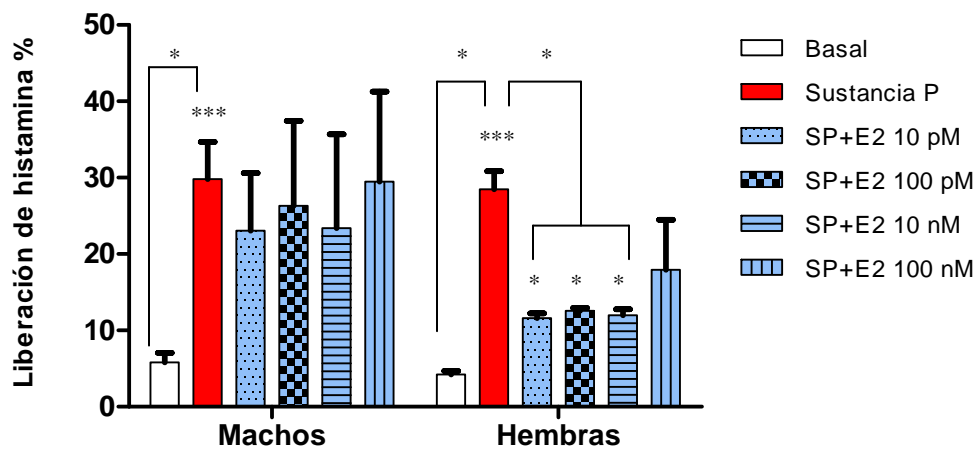


Figura 11. Efecto del estradiol en la liberación de histamina inducida por sustancia P, en CCP de ratas macho y hembra. Las CCPR macho y hembra se preincubaron con diferentes concentraciones de estradiol (E₂), durante 90 minutos y después se estimularon con SP durante 30 minutos en presencia del E₂. Se analizó el porcentaje de histamina liberada. La liberación de histamina de células cebadas sin estímulo (Basal) y células cebadas estimuladas solo con SP (10 μM), fueron incluidas como controles. Los valores son el promedio ± DS de tres experimentos independientes hechos por triplicado. (*) p < 0.05 y (***) p < 0.001 con respecto a la liberación basal

8.3 Efecto directo de los esteroides sexuales en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho.

Para observar el efecto de cada hormona esteroide sexual en la expresión del receptor FcεRI en las CCPR hembra y macho, estas se incubaron directamente con las distintas concentraciones de esas hormonas (10 pM, 100 pM, 10nM y 100 nM), por separado, durante 16 horas y la expresión del receptor se analizó por citometría de flujo. Como controles se usaron células sin tratamiento: sin teñir, con anticuerpo secundario-FITC y con los 2 anticuerpos primario anti-FcεRI y secundario-FITC.

Efecto directo de la progesterona en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho.

La P₄ no modificó la expresión del receptor FcεRI en las CCPR, independientemente del sexo y de las concentraciones de hormonas utilizadas. Tampoco se observó una diferencia significativa en la media de fluorescencia de la expresión del receptor FcεRI de células estimuladas con la hormona comparado con la expresión en células sin tratamiento o expresión basal (Figura 12).

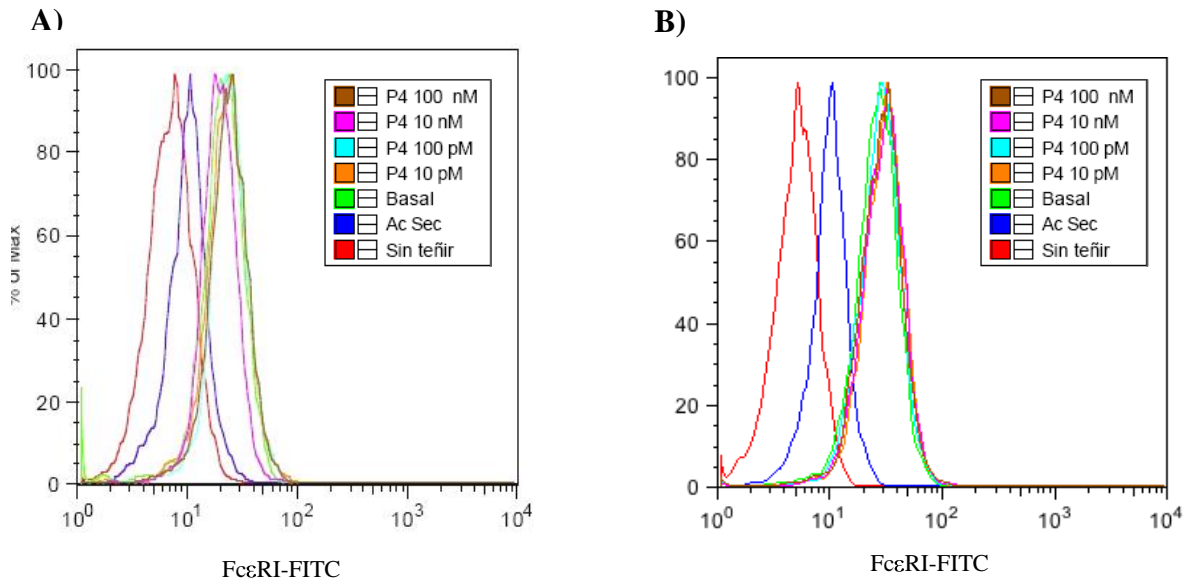


Figura 12. Efecto de la progesterona en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho. Las CCP de ratas hembra **A)** y macho **B)** se incubaron con diferentes concentraciones de P₄ durante 16 horas. Se ó la expresión del receptor FcεRI en la membrana de las células cebadas mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo primario anti FcεRI y un secundario conjugado a FITC. Se incluyeron como controles células sin tratamiento: sin teñir ■, con anticuerpo secundario-FITC ■, y con primario anti-FcεRI y secundario-FITC (basal) ■. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Efecto directo de la testosterona en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho.

La expresión del receptor FcεRI, no se modificó por el tratamiento directo con testosterona en CCPR independientemente del sexo. Como se puede observar en la Figura 13, no existe una diferencia significativa entre la media de fluorescencia de células sin tratamiento y células que si fueron tratadas con la hormona estos resultados se observan tanto en CCP de ratas hembra como en CCP de ratas macho (Figura 13).

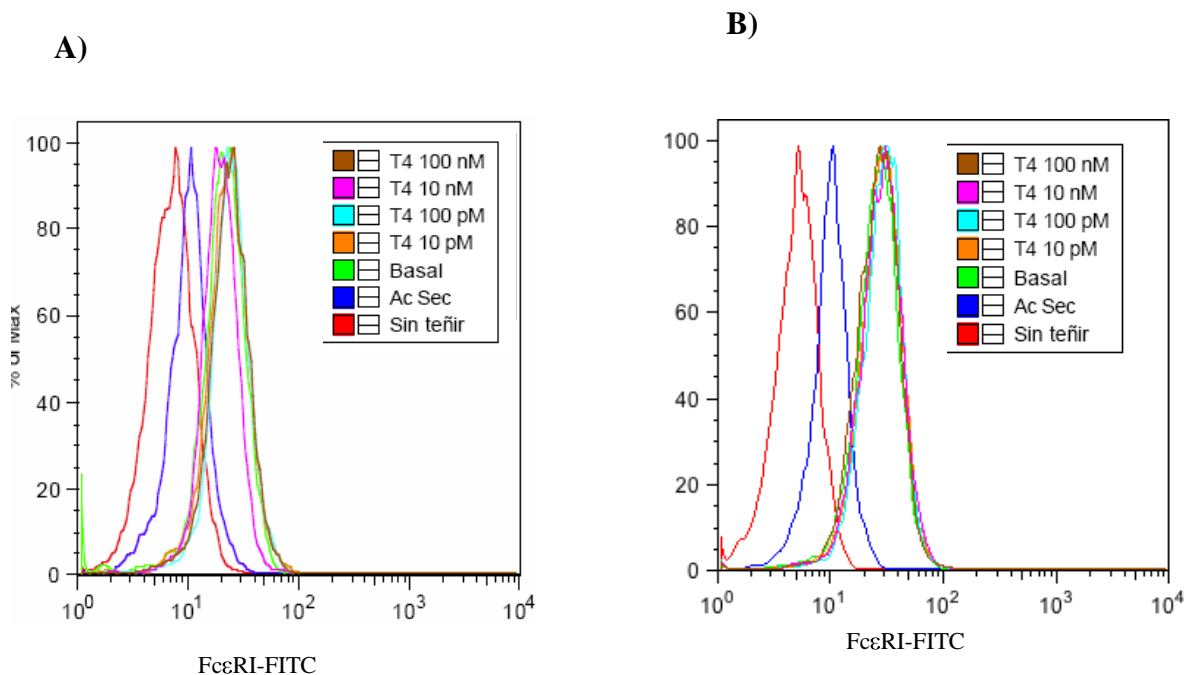


Figura 13. Efecto de la testosterona en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho. Las CCP de ratas hembra **a)** y macho **b)** se incubaron de forma directa con diferentes concentraciones de testosterona durante 16 horas. Se ó la expresión del receptor FcεRI en la membrana de las células cebadas mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo primario anti FcεRI y un secundario conjugado a FITC. Se incluyeron como controles células sin tratamiento: sin teñir ■, con anticuerpo secundario-FITC ■, y con primario anti-FcεRI y secundario-FITC (basal) ■. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Efecto directo de la dihidrotestosterona en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho.

La DHT tampoco no la expresión del receptor FcεRI de CCP de ratas hembra ni de ratas macho. De manera similar a lo observado con P₄ no se observa un cambio en la expresión del receptor entre las células sin tratamiento y las células tratadas con DHT (Figura14).

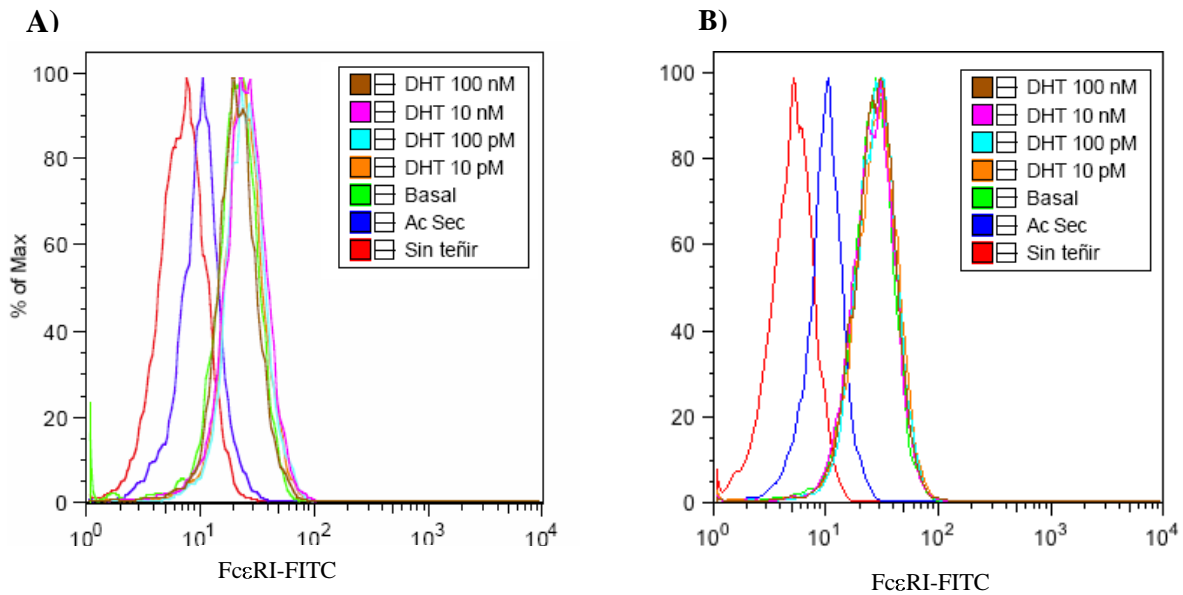


Figura 14. Efecto de la dihidrotestosterona (DHT) en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho. Las CCP de ratas hembra **A)** y macho **B)** se incubaron de forma directa con diferentes concentraciones de DHT durante 16 horas. Se ó la expresión del receptor FcεRI en la membrana de las células cebadas mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo primario anti FcεRI y un secundario conjugado a FITC. Se incluyeron como controles células sin tratamiento: sin teñir ■, con anticuerpo secundario-FITC ■, y con primario anti-FcεRI y secundario-FITC (basal) ■. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Efecto directo del 17 β- estradiol en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho.

El E₂ no tuvo un efecto significativo en la expresión del receptor FcεRI, ni en CCP de ratas hembra ni en CCP de ratas macho, a ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 15).

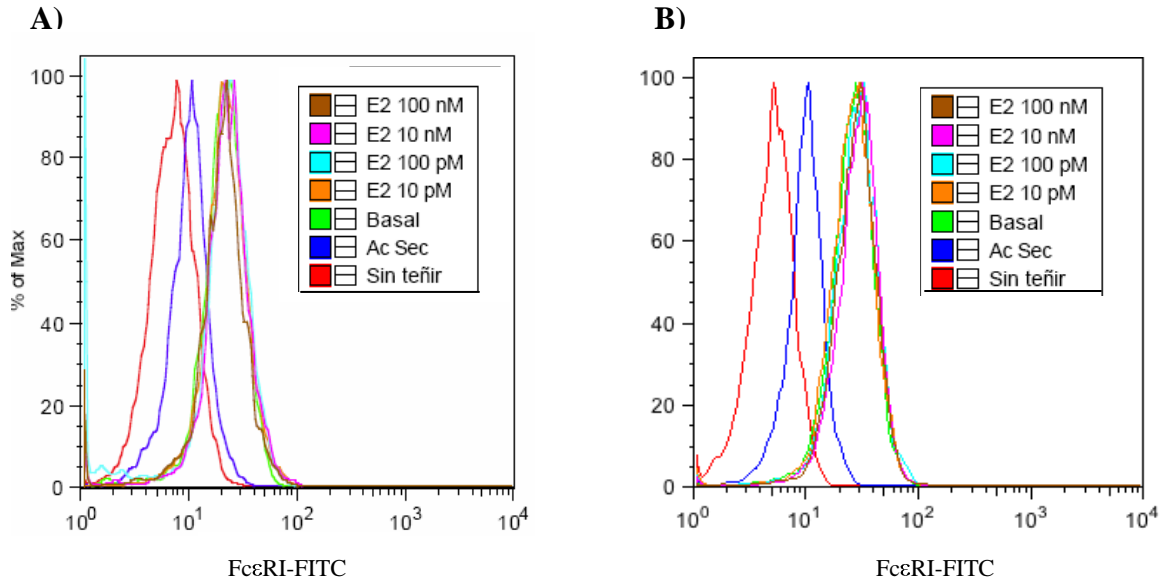


Figura 15. Efecto del estradiol en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho. Las CCP de ratas hembra **A)** y macho **B)** se incubaron con diferentes concentraciones de E₂ durante 16 horas. Se ó la expresión del receptor FcεRI en la membrana de las células cebadas mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo primario anti FcεRI y un secundario conjugado a FITC. Se incluyeron como controles células sin tratamiento: sin teñir ■, con anticuerpo secundario-FITC ■, y con primario anti-FcεRI y secundario-FITC (basal) ■. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

8.4 Efecto de los esteroides sexuales en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra y macho sensibilizadas con IgE.

Los resultados obtenidos indican que los esteroides sexuales no tuvieron efecto en la expresión del receptor FcεRI a ninguna de las concentraciones utilizadas, en CCP sensibilizadas con IgE, provenientes tanto de ratas hembra como macho (Figuras 16 y 17).

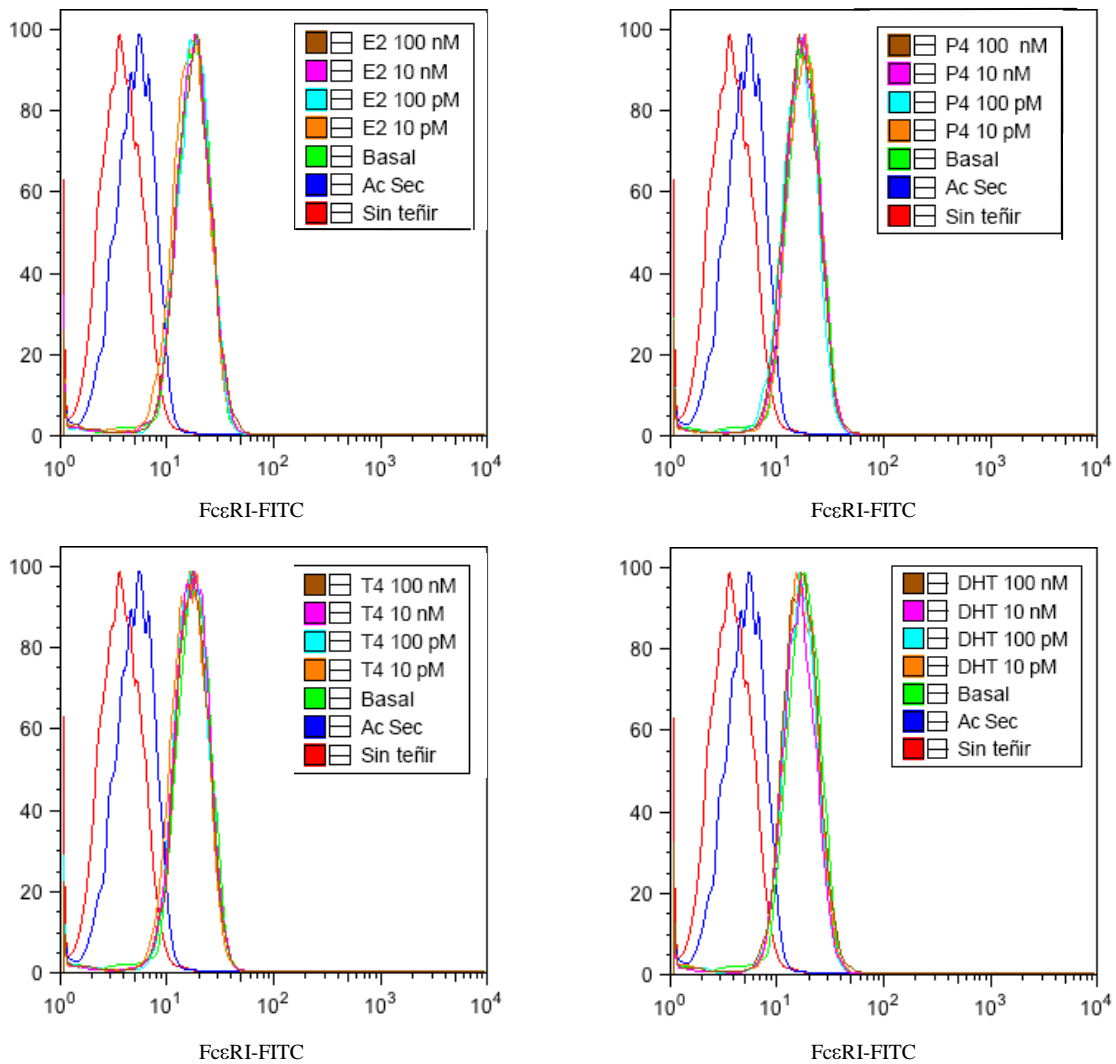


Figura 16. Efecto de los esteroides sexuales en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas hembra sensibilizadas con IgE. Las CCPR hembra se incubaron durante 16 horas con las diferentes concentraciones de progesterona (P4), testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT) y 17 β-estradiol (E₂) en presencia de IgE (5 μg/mL). Se ó la expresión del receptor FcεRI en la membrana de las células cebadas mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo primario IgE y un secundario anti-IgE conjugado a FITC. Se incluyeron como controles células sin tratamiento: sin teñir ■, con anticuerpo secundario-FITC ■, y con primario IgE y secundario anti IgE-FITC (basal) ■. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

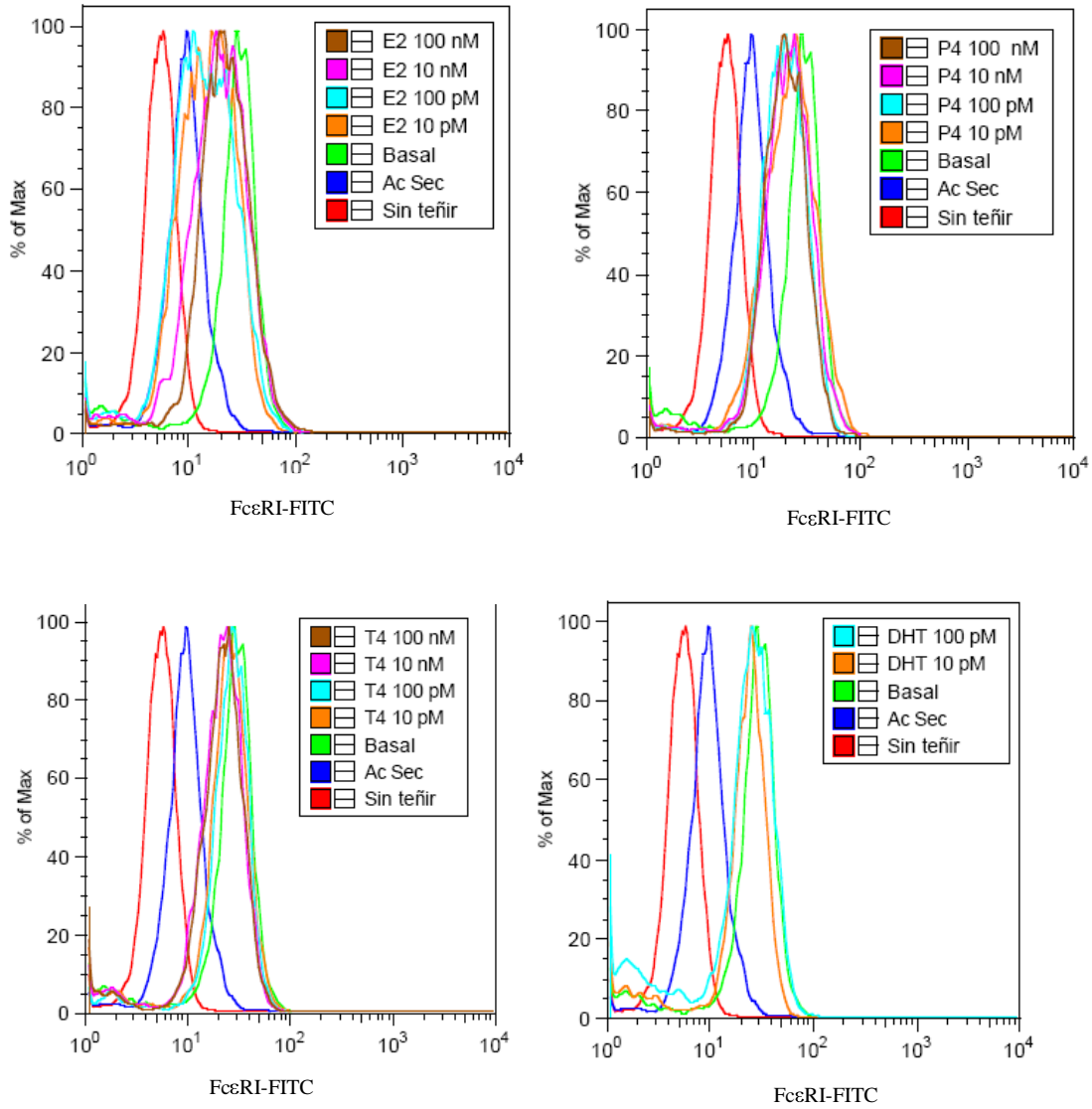


Figura 17. Efecto de los esteroides sexuales en la expresión del receptor FcεRI en CCP de ratas macho estimuladas con IgE. Las CCPR macho se incubaron durante 16 horas con las diferentes concentraciones de progesterona (P₄), testosterona (T) dihidrotestosterona (DHT), y 17 β-estradiol (E2), en presencia de IgE (5 μg/mL). Se ó la expresión del receptor FcεRI en la membrana de las células cebadas mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo primario IgE y un secundario anti-IgE conjugado a FITC. Se incluyeron como controles células sin tratamiento: sin teñir ■, con anticuerpo secundario-FITC ■, y con primario IgE y secundario anti IgE-FITC (basal) ■. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este estudio mostramos que los esteroides sexuales por si solos son capaces de aumentar la liberación de histamina únicamente en células cebadas de peritoneo de ratas hembra mientras que en ratas macho no tuvieron ningún efecto, observando por lo tanto que existe una diferencia en el efecto de los esteroides sexuales dependiente del sexo en la activación de las células cebadas. Este resultado puede ser importante en vista de que las células cebadas expresan receptores a progestágenos, andrógenos y estrógenos, (Pang *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2001). Estos resultados concuerdan con estudios previos los cuales demostraron que la testosterona y el E₂ no tienen un efecto directo en la liberación de histamina en células cebadas de peritoneo de rata macho (Vliagoftis *et al.*, 1992). Otro estudio se describió que la P₄ tampoco tuvo efecto por si sola (De Oliveira *et al.*, 2007). Estos estudios a diferencia del nuestro, no evaluaron el efecto de los esteroides en células cebadas provenientes de rata hembra, en las cuales nosotros si observamos un efecto directo con todos los esteroides utilizados. Respecto a la DHT no existen estudios previos que muestren su efecto en las células cebadas.

Las células cebadas pueden ser activadas vía IgE o por estímulos no inmunológicos como el compuesto 48/80, ionóforos de calcio y neuropéptidos como somatostatina y SP. En particular, la activación de las células cebadas por la SP ha sido implicada en una variedad de patologías, incluyendo ciertos desórdenes neuro-inmuno-endocrinos (Church *et al.*, 1989; Goezl *et al.*, 1990; Nieber *et al.*, 1991).

Existe evidencia que los neuropéptidos tienen un efecto importante en enfermedades alérgicas, ya que pueden modificar la permeabilidad microvascular y la función celular inflamatoria en las vías aéreas (Boomsma y Said, 1992; Church *et al.*, 1989). La SP es el neuropéptido más abundante en el pulmón y ejerce sus efectos vía receptores específicos. Su liberación provoca una serie de cambios locales incluyendo la alteración del flujo sanguíneo, la contracción del músculo liso, la secreción de moco, así como la degranulación de las células cebadas (Boomsma y Said, 1992).

Observamos que los esteroides sexuales son capaces de inhibir la liberación de histamina en células cebadas de peritoneo de ratas hembra cuando la SP es utilizada como estímulo. En células cebadas de ratas macho solo se observó el efecto de la dihidrotestosterona a las concentraciones 10 pM y 10 nM al aumentar la liberación de histamina inducida por sustancia P. Un estudio previo demostró que el estradiol aumenta la liberación de serotonina inducida por la SP en células cebadas de peritoneo de rata (Vliagoftis *et al.*, 1992). Sin embargo, no existen estudios previos que muestren el efecto de los esteroides sexuales en la liberación de histamina inducida por SP. Por lo tanto, nuestros resultados podrían marcar una pauta para que en estudios posteriores se evalúe el efecto de los esteroides en la liberación de otros mediadores producidos por células cebadas y la relación que este efecto puede tener con el desarrollo de enfermedades.

Las células cebadas y la SP han sido implicados en una serie de procesos patofisiológicos y los esteroides sexuales podrían ser utilizados con fines terapéuticos para la regulación inmune.

Por otra parte, durante una respuesta alérgica las células cebadas se activan debido a la unión del alérgeno a la IgE específica presente en la superficie de estas células. Esta activación se ve influenciada por el nivel de expresión del receptor para esta inmunoglobulina. Algunos estudios han mostrado que el nivel de expresión del FcεRI se ve aumentado en presencia de concentraciones elevadas de IgE, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, no se han identificado otros factores que podrían regular la expresión de este receptor. Nuestros resultados demostraron que los esteroides sexuales no tienen ningún efecto en la expresión del receptor FcεRI en células cebadas tanto de forma directa ni en células cebadas sensibilizadas con IgE. Lo anterior, sugiere que los esteroides por si solos tienen mayor influencia en la liberación de histamina y que su participación en las enfermedades alérgicas podría estar dada por un aumento en la degranulación de las células cebadas a través de sus receptores específicos. Esto último es apoyado por resultados anteriores que muestran que el E₂ no tuvo ningún efecto en la

degranulación de células cebadas sensibilizadas con IgE y estimuladas con anti-IgE, en ratas de ambos sexos (Vliagoftis *et al.*, 1992).

En conjunto los resultados de este estudio muestran que el efecto de los esteroides sexuales testosterona, DHT, progesterona y estradiol en células cebadas es dependiente del sexo ya que en células provenientes de ratas hembra por sí solos son capaces de aumentar la liberación de histamina pero no en células cebadas de ratas macho.

Estos esteroides también son capaces de inhibir la activación de estas células cuando la liberación de histamina es inducida por sustancia P. El efecto de los esteroides sexuales en la liberación de histamina ocurrió de forma dosis dependiente.

Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que este estudio fue realizado *in vitro* y por lo tanto no existe la participación de otras moléculas las cuales podrían contribuir de manera sinérgica a la activación de las células cebadas.

10. CONCLUSIONES

La progesterona, testosterona, dihidrotestosterona y el 17 β -estradiol, aumentaron la liberación de histamina en CCP de ratas hembra, pero no tuvieron efecto en la liberación de histamina en CCP de ratas macho.

El efecto de la progesterona, testosterona, DTH y el 17 β -estradiol, en la liberación de histamina fue dependiente del sexo, lo cual muestra una diferencia entre sexos del efecto de estos esteroides sexuales.

La testosterona tuvo un aumento significativo en la liberación de histamina en CCP de ratas hembra a las concentraciones de 100pM y 10 nM, mientras que en CCP de ratas macho no se observó un aumento a ninguna concentración probada, lo que muestra un efecto dependiente de la concentración y del sexo.

El 17 β -estradiol inhibió la liberación de histamina inducida por sustancia P en CCP de ratas hembra a las concentraciones 10 pM, 100 pM y 10 nM. En CCP de ratas macho no tuvo un efecto significativo en la liberación de histamina inducida por sustancia P.

La progesterona tuvo un efecto inhibitorio en la liberación de histamina inducida por sustancia P en CCP de ratas hembra a las concentraciones 10pM, 100 pM ,10 nM y 100 nM. En CCP de ratas macho no tuvo ningún efecto significativo.

La testosterona al igual que la dihidrotestosterona inhibió la liberación de histamina inducida por sustancia P en CCP de ratas hembra a todas las concentraciones utilizadas, mostrando una diferencia del efecto entre sexos ya que en CCP de ratas macho estas hormonas no tuvieron ningún efecto significativo.

Los esteroides sexuales por si solos no tuvieron un efecto en la expresión del receptor FcεRI a ninguna de las concentraciones utilizadas, ni en CCP de ratas hembra ni en CCP de ratas macho.

Las hormonas esteroides no participan en la expresión del receptor FcεRI a ninguna concentración en CCPR hembra y macho estimuladas con IgE.

11. REFERENCIAS

- ❖ Abraham, SN., Malaviya, R. 1997. Mast cells in infection and immunity. *Infection and Immunity*, 65 (9): 3501-3508.
- ❖ Belot, M., Abdennebi-Najar. 2007. Progesterone increases csk homologous kinase in HMC-1560 human mast cells and reduces cell proliferation, *J. Cell Biochem.* 102(5): 1271-1280.
- ❖ Besedovsky, H., Del Rey, A. 1996. Immune-Neuro-Endocrine Interactions; Facts and Hypotheses. 17 (1):64
- ❖ Boomsma, J., Said, S. 1992. The role of neuropeptides in Asthma. *CHEST*, 101: 389S-392S
- ❖ Bouman, A., Heneiman. 2005. Sex hormones and the immune response in humans, *Human Reprod. Update.* 11 (4):411-423.
- ❖ Brazis, P., De Mora, F., Ferrer, L., Puigdemont, A. 2002. IgE enhances FcεRI expression and IgE- dependent TNF- α release from canine skin. *Immunology and Immunopathology*, 85: 205-212
- ❖ Chen, W., Mempel, M., Schoeber, W., Behrendt, H., Ring, J 2008. Gender difference, sex hormones and immediate hypersensitivity reactions. *Allergy*, 63 (11): 1418-1427.
- ❖ Chen, Beck, I., Schober, W., Brockow K., Effner, R., Buters, JT., Behrendth. H., Ring, J. 2009. Human mast cells express androgen receptors but treatment with

- testosterone exerts no influence on IgE-independent mast cell degranulation elicited by neuromuscular blocking agents. *Exp Dermatol*, 19(3): 302-304.
- ❖ Chen, W., Beck, I., Schober, W., Brockow, K., Effner, R., Buters, JT., Behrendt, H., Ring, J. 2010. Human mast cells express androgen receptors but treatment with testosterone exerts no influence on IgE-independent mast cell degranulation elicited neuromuscular blocking. *Exp Dermatol*, 19 (3): 302-304.
 - ❖ Church, M., Benyon, R., Lowman, M., Huson, P., Holgate, S. 1989. Allergy or Inflammation? From neuropeptide stimulation of human skin mast cells to studies on the mechanism of the late asthmatic response. *Agents Actions*, 26 (1-2):22-30.
 - ❖ Cocchiara, R., Albegiani, G., Di Trapani, G., Azzolina, A., Lampiasi, N., Rizzo, F., Geraci, D. 1990. Modulation of rat peritoneal mast cell and human basophil histamine release by estrogens. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol.* 93(2-3):192-197.
 - ❖ De León y Montor 2006 . Dimorfismo sexual inmunitario: ¿Pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Revista de Investigación Clínica*, 58(2): 161-169.
 - ❖ De Oliveira, A., Domingos, H., Cavriani, G., Damazo, A., Franco, A., Oliani, S., Filho, R., Vargaftig, B., Lima, W. 2007. Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung inflammation are differentially modulated by progesterone and estradiol. *Am J. Physiol Cell Physiol*, 293: C1120-C1128.
 - ❖ Gaillard, R. 2003. Interactions between the immune and neuroendocrine systems: clinical implications. *Journal de la Société de biologie*, 197 (2): 89-95.

- ❖ Galli, S., Tsai, M. 2010. Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *European Journal of Immunology*, 40:1843-1851.

- ❖ Gibbons, A., Chang, M. 1972. Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and the dual response, *Biology of Reproduction*. 6: 193-203.

- ❖ Goetzl, EJ., Cheng, PP., Hassner, A., Adelman, DC., Frick, OL., Sreedharan, SP. 1990. Neuropeptides, mast cells and allergy: novel mechanisms and therapeutic possibilities. *Clin. Exp. Allergy*, 20 suppl 4: 3-7.

- ❖ Hernández, R, Muñoz, S., Nava, K., López, L., Hernández, R., Martínez, N., Sánchez A., Ramírez, R., Togno, C., Morales, J. 2011. El efecto de los esteroides sexuales sobre la inmunidad adquirida y su impacto en la autoinmunidad e infección. En: *Efectos no reproductivos de hormonas esteroides*. (Camacho, I., Morales, J., Velásquez, J. Ed.), pp. 71-90. Sociedad Mexicana de Parasitología México.

- ❖ Iwasaki, A., Medzhitov, R. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327: 291-295

- ❖ Jamur, M., Oliver, C. 2011. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Front Biosc, (Schol. Ed.)* 1(3): 1390-1406.

- ❖ Kalesnikoff, J., Galli, S. 2008. New developments in mast cells biology. *Nature Immunology*, 9(11): 1215-1223.

- ❖ Kasperska.-Zajac. 2010. Does dehydroepiandrosterone influence the expression of urticaria? *Inflammation*. A mini review. *Inflammation*. Published online: 05 August, 2010.
- ❖ Kasperska- Zajac., Brzoza, Z., Rogala, B.2008. Sex hormones and urticaria. *Journal of Dermatological Science*, (52): 79-86.
- ❖ Kawakami, T., Galli, SD. 2002. Regulation of mast cell and basophil function and survival by IgE. *Nat. Rev. Immunol*, 2 (10): 773 -786.
- ❖ Kumar, V., Sharma, A. 2010. Mast cells: Emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Molecular Immunology*, 48 (1-3): 14-25.
- ❖ Lau, H., Huang, Y., Law, K., 2009. Effects of oestrogenic agents on rat peritoneal mast cells. *Inflammation Research*, 58(1): s15-s16.
- ❖ Lee, T., Shahahan, F., Miller, H., Bienenstock, J., Befus, A. 1985. Intestinal mucosal mast cell: Isolation from rat lamina propria and purification using unit gravity velocity sedimentation. *Immunology*, (55):721-728.
- ❖ López-Pérez.,Morfin, M., Huerta, J., Mejía, F., López, J., Aguilar, G., Rivera, J., López, L., Vargas, F. 2009. Prevalencia de las enfermedades alérgicas en la ciudad de México, 56(3):77-79.
- ❖ Lorenzo, J. 2003. A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J. Clin. Invest*, 111:1641-1643.
- ❖ Marshall, J. 2004. Mast cell response to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, 4: 787-799.

- ❖ Metcalfe, D., Baram, D., Mekori, Y. 1997. Mast Cells. *Physiological Reviews*, 77(4): 1033- 1079.
- ❖ Muñoz-Cruz., Togno, C., Hernández, R., López, L., Tiempos, N., Trejo, I., Coronado, E., Navarro, K., López, V., Morales-Montor. 2011. Dimorfismo sexual inmunitario: Efecto de los esteroides sexuales sobre la inmunidad innata. 91-115. En: *Efectos no reproductivos de hormonas esteroides*. (Camacho, I., Morales, J., Velásquez, J. Ed.), pp. 91-115. Sociedad Mexicana de Parasitología México.
- ❖ Nieber K., Baumgarten, C., Witzel, A., Rathsack, R., Oehme, P., Brunnee, T., Kleine,-Tebbe, J., Kunke, G. 1991. The possible role of substance P in the allergic reaction, based on two different provocation models. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 94 (1-4):334-338.
- ❖ Nicovani, S., Rudolph, M. 2002. Estrogen receptors in mast cells from arterial walls. *Biocell*, 26 (1): 15-24.
- ❖ Okayama, Y., Kawakami, T. 2006. Development, migration and survival of mast cells *Immunology Research*, 34 (2): 97- 115.
- ❖ Pang , X., Cotreau- Bibbo, M., Sant, G., Theoharides, T. 1995. Bladder mast cell expression of high affinity oestrogen receptors in patients with interstitial cystitis. *Br J. Urol*, 75(2): 154-161.
- ❖ Prussin, C., Metcalfe, D. 2006. IgE, mast cell, basophils and eosinophils. *J. Allergy Clin Immunol*. 117 (Suppl mini-Primer), S450-S456.
- ❖ Puxeddu, I., Piliponsky, A., Bachelet, I., Levi-Shaffer, F. 2003 Mast cells in allergy and beyond. *Int J. Biochem. Cell Biol*, 35 (12): 1601-1607.

- ❖ Rivera, J., Gilfillan, AM. 2006. Molecular regulation of mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol*, 117 (6):1214-1225.
- ❖ Shanahan, F., Denburg, J., Bienenstok, J., Befus, A. 1984. Mast cell heterogeneity. *Can J Physiol Pharmacol*, 62 (6):734-737.
- ❖ Shirasaki, H., Watanabe, K., Kanaizumi, E., Konno, N., Sato, J., Narita, S., Himi, T. 2004. *Acta Otolaryngol*, 124 (8): 958-963.
- ❖ Siraganian, R. 1974. An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric análisis of histamine. *Analytical Biochemistry*, 57: 383-394.
- ❖ Soman, N., Ashley, J. 2010. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, (10): 440-452.
- ❖ Theoharides, T., Kempuraj, D., Tagen, M., Conti, P., Kalogeromitros, D. 2007. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunological Reviews*, 217: 65-78.
- ❖ Vasiadi, M., Kempuraj, D., Boucher, W., Kalogeromitros, D., Theoharide, T. 2006. Progesterone inhibits mast cell secretion. *Int. J immunopathol Pharmacol*, 19 (4): 787-794.
- ❖ Vliagoftis, H., Dimitriaou, V., Boucher, W., Rozniecki, J., Correia, I., Raam., S., Theoharides, T. 1992. Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *Int. Arch. Allergy Immunol*, (98): 398-409.

- ❖ Vliagoftis, H., Befus, A. 2005. Mast cells at mucosal frontiers. *Curr Mol Med*, 5(6):573-589.

- ❖ Wasiuk, A., De Vries, V., Hartmann, K., Roers, A., Noelle R. 2008. Mast cells as regulators of adaptative immunity to tumours. *Clinical and Experimental Immunology*, (155): 140- 146.

- ❖ World Allergy Organization 2008

- ❖ Yamaguchi, M., Lantz, C., Oettgen, H., Katona, I., Fleming, T., Miyajima, I., Kinet, J., Galli, S. 1997. IgE enhances mouse mast cell FcεRI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J. Exp. Med*, 185(4): 663-672.

- ❖ Yamaguchi M., Hirai, K., Komiya, A., Miyamasu, M., Furomoto, Y., Teshima, R., Ohta, K., Morita, Y., Galli, S., Ra, C., Yamamoto, K. 2001. Regulation of mouse mast cells surface FcεRI expression by dexametasona. *International Immunology*. 13(7): 843-851.
- ❖ Yong, L. 1997. The mast cell: origin, morphology, distribution and function. *Exp. Toxicol. Pathol*, 49(6): 409-424.

- ❖ Zaitzu, M., Narita, S., Lambert, K., Grady, J., Estes, D., Curran, E., Brooks, E., Watson, C., Goldblum, R., Horiuti, T. 2007. Estradiol activates mast cell via non genomic estrogen receptor-α nd calcium influx. *Molecular Immunology*, (44): 1977-1985.

- ❖ Zhao, X, McKerr, G., Dong, Z., Higgins, C., Carson, J., Yang, Z., Hannigan, B. 2001. Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but

not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways.
Thorax, 56:205-211.