



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Determinación de la activación en mastocitos  
humanos (LAD2) por efecto del bisfenol A (BPA)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LIC. EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:  
MARÍA SOLEDAD DÍAZ QUIROZ**

**ASESORA:  
DRA. SAMIRA MUÑOZ CRUZ**

**COASESOR:  
M.V.Z. ÁNGEL GERMÁN MARTÍNEZ SOSA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Determinación de la activación en mastocitos humanos (LAD2) por efecto del bisfenol A (BPA).

Que presenta la pasante: **María Soledad Díaz Quiroz**

Con número de cuenta: **311228830** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de diciembre de 2018.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
<b>VOCAL</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Raquel María del Refugio Tapia Romero	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## **Reconocimientos**

El presente proyecto fue elaborado en el laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Samira Muñoz Cruz, con la clave de proyecto CONACYT **223678**; con N° de becario CONACYT **26421**.

## Dedicatorias

El presente trabajo, va dedicado con mucho amor y dedicación, a todos los seres afectados por los sismos ocurridos en septiembre del 2017, dedicado a ellos pues admiro la valentía y tenacidad por aferrarse a la vida a pesar de que en muchos de los casos perdieron todo.

De igual manera dedico esté trabajo a los seres que demostraron los más bellos valores, que son, la solidaridad y la unidad, pues gracias a todo esté esfuerzo, logramos seguir adelante; por que en tan sólo un mes de dicha tragedia aprendí a que no sólo se tiene que tener la dicha de vivir, si no de saber vivir.

Una dedicación más, de todo corazón, a la biblioteca comunitaria José Revueltas, por enseñarme la esperanza, la utopía, la perseverancia y sobre todo la pasión.

**“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. ¿Entonces para qué sirve la utopía?  
Para eso, sirve para caminar”.**

**-Fernando Birri/Eduardo Galeano**

## Viento de lucha

El viento de lucha nos amontona cual hojas de otoño,  
como cuando termina la primavera.

Pensarás que hemos callado, que hemos dejado de amar,  
de soñar, de vivir, de luchar.

El viento de lucha nos amontona,  
en algún lugar de nuestra amada tierra.

Pensarás que hemos olvidado,  
te equivocas; aprendimos a perdonar, pero jamás olvidamos.

El viento de lucha nos amontona, ahí en cualquier rincón  
abrigados por la madre tierra.

Tratarán de apaciguar lo inevitable,  
pero el viento de lucha nos amontona  
para al fin gritar:

¡Libertad! ¡Justicia! ¡Amor! ¡Dignidad!

Por eso te digo ¡Lucha! ¡Lucha! ¡Lucha!

Lucha junto a mí, lucha por no sólo tener la dicha de vivir,  
sí no de saber vivir.

No tengan miedo; porque sólo así, volverá la primavera.

Soledad Díaz

## Agradecimientos

Agradezco a Porfirio Díaz, por darme la simple dicha de existir.

Agradezco a mi madre por guiarme y mostrarme la dualidad de la vida, porque no cambiaría nada de lo que me brindó, porque gracias a eso, me forjó carácter para seguir adelante; por darme toda la confianza y amor durante mi camino, por darme a un amigo irremplazable al que he aprendido a amar: Lalito.

Agradezco a mi alma máter, por enseñarme a soñar y a guiarme para despertar, y emprender mis sueños.

Agradezco a mis dos mayores amigas, mis hermanas, por cuidarme y enseñarme a cuidar de los demás.

Agradezco a mi abuelo Ernesto, y a mi tío Fer por darme el cariño, cuidados y consejos, pero sobre todo porque me enseñaron a apreciar la vida y a ser una mujer valiente y generosa.

Agradezco a mis segundas madres Guadalupe, Lucía, Carmen y Doña Marí, por criarme con mucho amor y comprensión, por ser mis confidentes y alcahuetas.

Agradezco a mis dos grandes amores, Lucía y Mariana, por hacerme sentir los sentimientos más cercanos a los de ser una madre.

Agradezco a toda mi familia, porque con el apoyo y amor de ellos, me impulse para poder concluir mis estudios.

Por último agradezco a todos mis amigos y amigas de tan diversas edades y nacionalidades, y a todos mis amores.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	<i>La comunicación celular por mastocitos</i>
Fig. 2	<i>Principales mecanismos de activación de mastocitos por patógenos</i>
Fig. 3	<i>Estructura química del Bisfenol A</i>
Fig. 4	<i>Cuantificación de la liberación de <math>\beta</math>-hexosaminidasa</i>
Fig. 5	<i>Determinación de TNF-<math>\alpha</math> en mastocitos humanos (LAD2) mediante ELISA Sandwich</i>
Fig. 6	<i>Expresión génica de quimasa en LAD2</i>
Fig. 7	<i>Expresión génica de triptasa en LAD2</i>
Fig. 8	<i>Expresión génica de IL-4 en LAD2</i>
Fig. 9	<i>Expresión génica de IL-8 en LAD2</i>
Fig. 10	<i>Expresión génica de TNF-<math>\alpha</math> en LAD2</i>
Fig. 11	<i>Expresión génica de TGF-<math>\beta</math> en LAD2</i>
Fig. 12	<i>Expresión génica de VEGF en LAD2</i>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características y funciones de los constituyentes del gránulo de mastocitos
Tabla 2	Principales clases de mediadores liberados por mastocitos
Tabla 3	Características de los iniciadores usados en la RT-PCR
Tabla 4	Principales diferencias funcionales entre los mastocitos murinos y humanos

## ABREVIATURAS

AP-1	<i>Proteína activadora 1</i>
BPA	<i>Bisfenol A</i>
C3	<i>Componente 3 del complemento</i>
C5	<i>Componente 5 del complemento</i>
CCL5	<i>Quimiocina ligando tipo 5</i>
CD	<i>Cúmulo de diferenciación</i>
cDNA	<i>Ácido desoxirribonucleico complementario</i>
CPA	<i>Célula presentadora de antígeno</i>



ADN	Ácido desoxirribonucleico
E2	Estradiol
MEC	Matrix extracelular
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPA	Agencia de protección al medio ambiente
ER	Receptor de estrógenos
Fc	Fragmento cristizable
FDA	Food and Drugs Administration
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GPER	Receptor de estrógeno acoplado
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
JNK	Cinasas c-Jun N-termina
LTB4	Leucotrieno B4
LTC	Linfocitos T citotóxicos
MAPK	Proteincinasas activadas por mitógenos
MCP1	Proteína quimiotáctica de monocitos
MMP	Metaloproteinasas de matrix
p-38	Cinasa p-38
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PGI2	Prostaciclina 1
PGE2	Prostaglandina E2
PXR	Receptor de pregnano X humano
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ARN	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscriptasa
SCF	Factor de células madre
SNARE	Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
VAMP	Proteína de membrana asociada a vesículas
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. MARCO TEÓRICO .....	7
3.1 Generalidades sobre los mastocitos .....	7
3.2 Mediadores de mastocitos .....	10
3.3 Activación de los mastocitos.....	14
3.4 Disruptores endocrinos .....	18
3.5 Bisfenol a (BPA).....	19
3.6 Importancia de estudiar el impacto de los bisfenoles como disruptores endocrinos .....	20
3.7 Mastocito y BPA.....	21
4. JUSTIFICACIÓN .....	22
5. HIPÓTESIS.....	24
6. OBJETIVO GENERAL .....	24
7. OBJETIVOS PARTICULARES .....	24
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
8.1 Cultivo celular de mastocitos humanos (LAD2) .....	25
8.2 Determinación de liberación de $\beta$ -hexosaminidasa .....	26
8.3 Determinación de TNF- $\alpha$ mediante ELISA sándwich.....	27
8.4 Determinación del efecto del BPA en la expresión de genes en mastocitos humanos (LAD2) .....	27
8.5 Extracción y cuantificación de RNA .....	28
8.6 Síntesis de ADN complementario (cDNA) .....	29
8.7 Amplificación de cDNA por PCR tiempo final (RT-PCR).....	29
8.8 Análisis estadístico .....	31
9. DIAGRAMA GENERAL DEL TRABAJO .....	32
10. RESULTADOS .....	33
10.1 Cuantificación de la liberación de $\beta$ -hexosaminidasa.....	33
10.2 Cuantificación de TNF- $\alpha$ en mastocitos humanos (LAD2) mediante ELISA sándwich .....	34
10.3 Expresión génica de quimasa .....	35

10.4 Expresión génica de triptasa .....	36
10.5 Expresión génica de IL-4 .....	37
10.6 Expresión génica de IL-8 .....	38
10.7 Expresión génica de TNF- $\alpha$ .....	39
10.8 Expresión génica de TGF- $\beta$ .....	40
10.9 Expresión génica de VEGF .....	41
11. DISCUSIÓN .....	42
12. CONCLUSIONES .....	47
13. PERSPECTIVAS .....	48
13. REFERENCIAS .....	49
ANEXOS.....	57

## 1. RESUMEN

El bisfenol A es un disruptor endocrino, que ha sido utilizado de manera desmesurada en la producción de policarbonatos-plásticos, tales como envases destinados a contener alimentos, así como en diversos productos de uso cotidiano; recientemente se ha reportado que el BPA puede interferir y alterar las funciones de las células del sistema inmune, y se ha asociado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias y alérgicas, estudios sugieren que el BPA posee potencial para la desregularización de la respuesta de los mastocitos.

La reacción alérgica es una respuesta hipersensible que se caracteriza por la activación de mastocitos, los cuales poseen la capacidad de producir enormes cantidades de moléculas pro-inflamatorias al ser activadas; Por lo tanto, conocer si la degranulación de estas células es causada por la estimulación con BPA, podría abrir el panorama para conocer las posibles consecuencias de la exposición al BPA.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la degranulación (liberación inmediata) y síntesis de *novo* de mediadores de mastocitos humanos (LAD2) por la exposición a BPA, mediante la determinación de la liberación de beta-hexosaminidasa, y la cuantificación de la secreción de TNF- $\alpha$ , así como la determinación de la expresión de los genes de triptasa, quimasa, TNF, VEGF, TGF-beta, IL-4 e IL-8. Los resultados obtenidos, indican que el BPA no estimula la degranulación de los mastocitos, ni la producción de TNF- $\alpha$ . Sin embargo se encontró que el BPA aumentó de manera significativa los niveles de expresión de los genes de Triptasa, IL-8 y VEGF, mientras que no afectó los niveles de expresión de los genes TNF- $\alpha$  e IL-4.

## 2. INTRODUCCIÓN

La utilización desmesurada de policarbonatos en la vida cotidiana durante los últimos años, ha traído consigo el incremento de una gran variedad de compuestos contaminantes en el medio ambiente, que resulta en una mayor exposición, tanto del ser humano como de otras especies. Entre dichos contaminantes se encuentran los denominados compuestos disruptores endocrinos, que son sustancias químicas que pueden presentar actividad estrogénica, anti-estrogénica, andrógena o anti-androgénica, capaces de alterar el sistema hormonal y ocasionar diferentes daños en la salud (De Coster & van Larebeke, 2012). Estos compuestos son altamente lipofílicos y se almacenan por periodos prolongados en el tejido adiposo (Heindel, 2003). Ejemplo de estos compuestos son los bisfenoles (Minguez-Alarcon *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016).

Los bisfenoles son químicos utilizados masivamente, a nivel mundial, en la producción de policarbonatos-plásticos, empleados en la fabricación de una variedad de envases destinados a contener alimentos, así como en biberones y en resinas epóxicas, presentes en el recubrimiento de latas contenedoras de alimentos, selladores dentales, juguetes y otros artículos de uso cotidiano (Lee & Lim, 2011).

Existen diferentes rutas de exposición a estas sustancias, tales como oral, por inhalación y por contacto dérmico (Kuruto-Niwa *et al.*, 2007).

El bisfenol A (BPA) es el bisfenol más usado y se sabe que puede liberarse de los materiales que lo contienen durante el calentamiento o por mecanismos enzimáticos, por lo que la principal fuente de exposición a este compuesto es por vía oral, a través de alimentos y bebidas que han estado en contacto con materiales fabricados con BPA (Lee & Lim, 2012). La exposición a BPA está muy extendida, se ha encontrado presente en sangre, orina y otros tejidos en población humana, razón por la cual ha originado preocupación a nivel mundial. Datos del Sistema de Vigilancia Nacional de Salud de Estados Unidos, reporta que 93% de los ciudadanos de ese país, de 6 años y mayores, presentan niveles de BPA detectables en la orina (Seachrist *et al.*, 2016).

En los últimos años el BPA ha sido objeto de polémica. Los estudios y la preocupación por sus efectos sobre la salud han crecido considerablemente, convirtiendo al BPA en un protagonista en la prensa, de muchas publicaciones científicas y de opiniones científicas de las autoridades competentes (Juan-García & Gallego C, 2015).

El valor de Ingesta Diaria tolerable (IDT) del BPA ha sido modificado en el último informe realizado por la EFSA (European Food Safety Authority) en el 2015, y ha pasado de 4µg/kg/día a 50µg/kg/día (EFSA, 2015). En referencia al análisis de la exposición del BPA realizado por la EFSA, este concluye que la exposición dietética no supera el valor de IDT para ningún grupo de edad, ya que los niveles calculados se encuentran 3- 4 veces por debajo del valor de IDT. También se hace referencia y se apunta que la evaluación del exposición de fuentes no dietéticas presenta cierta incertidumbre y debe ser estudiada (EFSA, 2018)

Diversos estudios experimentales han encontrado que la exposición a BPA puede contribuir al desarrollo de cáncer de mama y próstata, principalmente porque este compuesto puede alterar funciones celulares importantes como la diferenciación, proliferación y muerte (Gao *et al.*, 2016). Por lo que se ha sugerido que el BPA debe ser catalogado como un carcinógeno humano debido a sus propiedades de promover el desarrollo de cáncer (Seachrist *et al.*, 2016).

El BPA también puede tener efectos negativos en el sistema inmunológico y se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro*, que demuestran que puede alterar el funcionamiento de las células del sistema inmune, como son macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B (Rogers *et al.*, 2013).

Tanto la FDA como la EFSA, se comprometieron a evaluar los efectos del BPA, y actualmente está en desarrollo un programa de investigación llamado CLARITY-BPA por sus siglas en inglés (Consortium Linking Academic Regulatory Insight on BPA toxicity), para estudiar la gama completa de posibles efectos en la salud por la exposición al BPA y para proporcionar datos que pueden usarse para tomar decisiones regulatorias. Se espera que el resultado final de esa evaluación esté disponible a finales de 2019 (NTP, 2018).

Aunque en los últimos años se han realizado diversos estudios *in vitro* e *in vivo* para demostrar los diferentes efectos dañinos del BPA, los estudios respecto al efecto directo del BPA en células del sistema inmunológico humano son pocos. Concretamente, la información de los efectos del BPA en la respuesta de mastocitos humanos, es casi nula. Dado el papel relevante del mastocito en diversos procesos inmunológicos y en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, resulta relevante estudiar los efectos del BPA en la activación de mastocitos humanos, así como en la producción de mediadores inflamatorios de respuesta inmediata (degranulación) y tardía (síntesis de *novo*), involucrados en el desarrollo de enfermedades inflamatorias.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Generalidades sobre los mastocitos

Los mastocitos o células cebadas fueron identificadas por primera vez en el mesenterio de la rana por el Dr. Von Recklinghausen en 1863 (Moon *et al.*, 2010), pero estas células fueron descritas por Paul Ehrlich en 1877, denominándolas Mastzellen (en alemán “bien alimentadas”) ya que pensaba que sus gránulos eran restos de un proceso fagocítico de alimentos que tomaban del tejido donde se encontraban (Ehrlich, 1879)

Los mastocitos proceden de progenitores hematopoyéticos (CD34+/CD117+/CD13+), derivados de la médula ósea que circulan en la sangre y logran su maduración en los tejidos. Los detalles de su diferenciación y diversificación fenotípica se conocen de forma incompleta (Moon *et al.*, 2010) Los mastocitos humanos proliferan gracias a la influencia de diversos factores de crecimiento tales como SCF e IL-3, citocinas que de igual manera regulan el desarrollo de los subtipos de mastocitos (Toru *et al.*, 1998)

Los mastocitos son células longevas, pueden sobrevivir durante meses o años en los tejidos, y a pesar de estar terminalmente diferenciadas, pueden proliferar en respuesta a señales adecuadas. Se caracterizan por presentar prominentes gránulos en su citoplasma donde almacenan una variedad abundante de mediadores inflamatorios los cuales si se liberan en exceso, tienen la capacidad de desarrollar una respuesta inflamatoria, enfermedades agudas, asma atópica iniciando una respuesta inflamatoria (Deb, 2004). Se encuentran distribuidos en todo el cuerpo, particularmente en las proximidades de las superficies que están en contacto con el medio externo (pulmón, piel, vasos sanguíneos, y mucosa en general) (Rojas W., 2015). En estas localidades, se encuentran bien situados para funcionar como centinelas en la defensa del hospedero.

Los mastocitos son células clave en la vigilancia de patógenos, actuando tanto en la inmunidad innata y adaptativa. Además, participan en funciones que favorecen la homeostasis, como la inmunomodulación, reparación de tejidos lesionados, crecimiento piloso



y remodelación ósea. Sin embargo, muchos de sus productos están asociados con diversas condiciones patológicas como enfermedades agudas y asma atópica (Soman & Ashley, 2010)

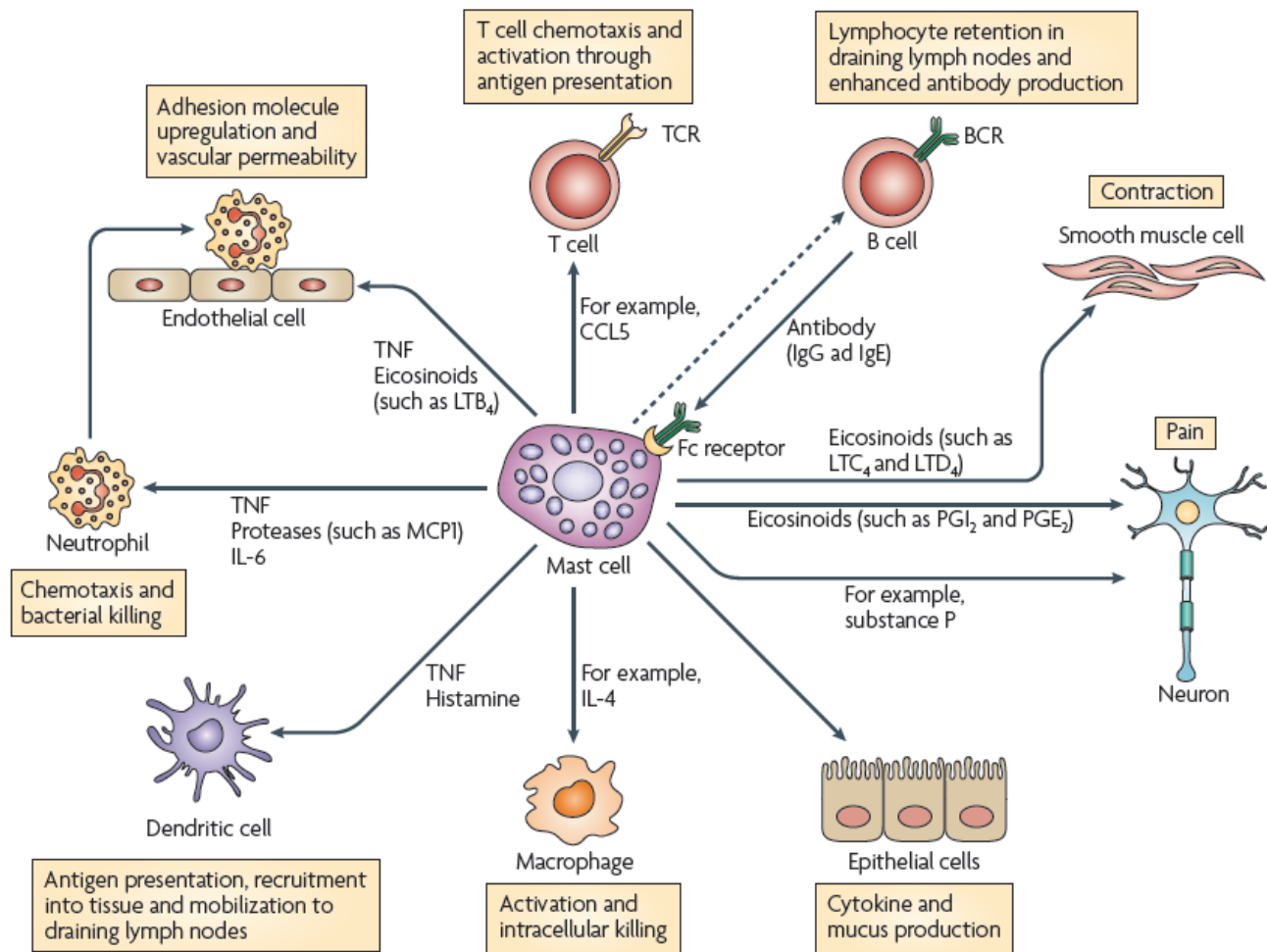
Durante las primeras etapas de una infección, los mastocitos se comunican con diversas estirpes celulares para alertar la presencia de dichos patógenos y poner en marcha diversos mecanismos para la eliminación de estos (Figura 1).

Los mastocitos son una de las primeras células en responder a cambios fisiológicos e interactuar con antígenos exógenos, toxinas y alérgenos, convirtiéndolos en la célula central del mantenimiento de la homeostasis de diversos tejidos (Rigoni, 2015)

Los mastocitos participan en la inflamación, liberando los mediadores contenidos en sus gránulos, principalmente histamina, serotonina, heparina y proteasas. Además, producen prostaglandinas y leucotrienos, que se obtienen a partir del ácido araquidónico de la membrana, por acción de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa respectivamente. Estos mediadores al ser liberados son capaces de inducir broncoconstricción, secreción de moco y edema; respuestas pro-inflamatorias necesarias para la estimulación del sistema inmune. Adicionalmente, los mastocitos también producen citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e IL-4/ IL-13 que contribuyen a la producción de IgE, al reclutamiento de eosinófilos y otras estirpes celulares. En situaciones patológicas, los mastocitos aumentan la producción de estos compuestos participando de manera directa en procesos inflamatorios (Boyce, 2003).

Los mastocitos presentan tres propiedades que los caracterizan

1. Habilidad para liberar de manera rápida y selectiva, mediadores apropiados para desencadenar la respuesta inmune innata
2. Capacidad para inducir el reclutamiento de células efectoras debido a su ubicación.
3. Capacidad para modificar las respuestas posteriores a la infección mediante la activación dependiente de anticuerpos, teniendo así efectos en la respuesta inmune adaptativa (Marshall, 2004)



**Figura 1. La comunicación celular por mastocitos promueve la defensa del hospedero.** La comunicación de los mastocitos con diferentes tipos de células, incluidas las células inmunes (como los linfocitos B y T) macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, células epiteliales, células del músculo liso y células endoteliales. Estas interacciones contribuyen a la vigilancia e inmunidad frente al patógeno y otros mecanismos de eliminación de los microorganismos en el hospedero. Estas dianas celulares de los mastocitos se encuentran tanto en el sitio de la infección como en los ganglios linfáticos distantes. Ejemplos de las consecuencias funcionales de la comunicación de los mastocitos son mostrados con los mediadores de los mastocitos que han demostrado contribuir al objetivo la respuesta celular. En "Mast cell-orchestrated immunity to pathogens" por Soman N. Abraham Et al. *Nature Reviews Immunology*, vol 10; 440-452.

## 3.2 Mediadores de mastocitos

Dentro de los gránulos de los mastocitos se encuentra una amplia gama de mediadores que son liberados en respuesta a estímulos apropiados, esta diversidad de mediadores explica como los mastocitos pueden participar en diferentes funciones homeostáticas y si no existe una regulación adecuada de estos, puede provocar fisiopatologías severas (Wernersson & Pejler, 2014)

La degranulación o liberación inmediata del contenido granular puede ocurrir por diversos estímulos externos, siendo el más conocido la activación mediada a través del receptor de alta afinidad para la IgE ( $Fc\epsilon RI$ ). También puede efectuarse la degranulación en respuesta a la activación del complemento, neuropéptidos y ciertas toxinas; sin embargo es importante señalar que, además de inducir la liberación de mediadores preformados en lo gránulos, la activación de mastocitos conduce a la síntesis de *novo* de muchos compuestos bioactivos, incluyendo derivados de lípidos, factor de activación de plaquetas, así como citocinas y quimiocinas (Wernersson & Pejler, 2014)

Los gránulos de los mastocitos contienen una multitud de componentes preformados, la histamina es probablemente la más conocida, pero también los gránulos pueden contener serotonina, otra característica de los gránulos de mastocitos es que poseen la capacidad de almacenar ciertas citocinas y factores de crecimiento preformados, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Arvan, 1998). La tabla 1 y 2 detallan las características y funciones de los constituyentes del gránulo de mastocitos

**Tabla 1. Características y funciones de los constituyentes del gránulo de mastocitos (Tomado de Wernersson & Pejler, 2014)**

Constituyente del gránulo	Característica clave	Función propuesta o potencial
<b>Enzimas Lisosomales</b>		
$\beta$ -hexosaminidasa	Enzima implicada en la fracturación de carbohidratos. Utilizado como marcador de mastocitos en respuesta a la degranulación	Probable papel en procesos normales de degradación lisosómica.
$\beta$ -lucuronidasa, $\beta$ -D-galactosidasa	Enzima implicada en la fracturación de carbohidratos.	Probable papel en procesos normales de degradación lisosómica.
Ariilsulfatasa A	Enzima implicada en la fracturación de glicoesfingolípidos.	Probable papel en procesos normales de degradación lisosómica.
Catepsina B	Cistein proteasa.	Implicada en procesos pro-tripatasa Probable papel en procesos de degradación lisosómica.
Catepsina C	Cistein proteasa.	Crucial para el procesamiento de pro-quimiasas. Probable papel en procesos normales de degradación lisosómica.
Catepsina E	Proteasa aspártica.	Papel en el procesamiento de pro-CPA3. Probable papel en procesos normales de degradación lisosómica.
<b>Aminas biogénicas</b>		
Histamina	Presente en todos los subtipos y especies de mastocitos.	Induce broncoconstricción, vasodilatación y permeabilidad vascular. Posible señalización entre mastocitos y terminaciones nerviosas.
Serotonina	Altos niveles en mastocitos de ratones. Bajos niveles en mastocitos de humanos.	Neurotransmisor. Posible señalización entre mastocitos y terminaciones nerviosas.
Poliaminas (Por ejemplo espermidina y espermina)	Componentes presentes en células de mamíferos.	Regula la ultraestructura de los gránulos y el almacenamiento de histamina, serotonina y $\beta$ -hexosaminidasa.

<b>Citocinas y factores de crecimiento</b>		
TNF- $\alpha$	Primer citocina que se encuentra almacenada en el gránulo del mastocito.	Actividad pro-inflamatoria.
IL-4	Liberado por la activación del receptor para Ig-E.	Papel potencial en la respuesta TH <sub>2</sub> dirigida por mastocitos.
bFGF	Asociado con la heparina.	Implicado en procesos angiogénicos por mastocitos.
VEGF	Liberado por la activación del receptor para Ig-E.	Implicado en procesos angiogénicos por mastocitos.
TGF- $\beta$	Liberado durante la degranulación.	Implicado en procesos pro-fibroticos y antiinflamatorios por mastocitos.
Factor de crecimiento nervioso	Liberado por la activación del receptor para Ig-E.	Implicado en posibles interacciones entre los mastocitos y terminaciones nerviosas periféricas.
IL-5	Almacenada en el gránulo del mastocito.	Papel potencial en el reclutamiento y activación de eosinófilos.
IL-6	Almacenada en el gránulo del mastocito.	Actividad pro-inflamatoria.
Stem cell factor	Almacenada en el gránulo del mastocito.	Factor de crecimiento principal.
<b>Proteasas específicas de mastocitos</b>		
Triptasa	Serin proteasas. Alta expresión en mastocitos.	Función dual, protectora o perjudicial durante la inflamación.
Quimasa	Serin proteasas. Alta expresión en mastocitos.	Funcione protectora o perjudicial durante la inflamación.
CPA3	Metaloproteinasa. Alta expresión en mastocitos.	Esencial para la protección contra ciertas toxinas.
<b>Proteasas no específicas de mastocitos</b>		
Catepsina G	Serin proteasa. Principal producto de neutrofilos.	Quizá contribuye como antibacterial.
MMP9	Metaloproteinasa. Se activa por quimasa.	Quizá contribuye como antibacterial en el EXC.
Granzima B	Serin proteasa. Principal producto de linfocitos citotóxicos.	Implicado en los efectos pro-apoptóticos de los mastocitos.
Renina	Ácido aspártico proteasa.	Implicado en la generación de angiotensina II mediada por mastocitos.
<b>Proteínas asociadas a la membrana del gránulo</b>		
VAMP2, VAMP3, VAMP7 and VAMP8	v-SNAREs	En mastocitos humanos VAMP7 y VAMP8 tiene efecto funcional en la degranulación.
Syntaxina 3	t-SNARE	Contribuye tanto al gránulo-gránulo como al gránulo-plasma en fusión de membrana.

**Tabla 2. Principales clases de mediadores liberados por mastocitos (Tomado de Marshall, 2004)**

<b>Mediador</b>	<b>Funciones</b>
<b>Granulo-asociado</b>	
Histamina y serotonina	Aumenta la permeabilidad vascular
Heparina	Angiogénesis
Triptasa, quimasa y otras proteasas	Remodelación de tejido y reclutamiento de células efectoras
TNF, VEGF y FGF2	Reclutamiento de células efectoras y mejoran la angiogénesis
<b>Derivados de lípidos</b>	
LTC <sub>4</sub> , LTB <sub>4</sub> , PGD <sub>2</sub> , y PGE <sub>2</sub>	Reclutamiento de células efectoras, regulan la respuesta inmune, promueven angiogénesis y broncoconstricción
<b>Citocinas</b>	
TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, GM-CSF, LIF, IFN- $\alpha$ e IFN- $\beta$	Induce la inflamación
IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-5 e IL-16	Funciones de citocinas para T helper tipo 2
IL-12 e IFN- $\gamma$	Funciones de citocinas para T helper tipo 1
IL-10, TGF- $\beta$ y VEGF	Regulan la inflamación y angiogénesis
<b>Quimiocinas</b>	
CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 Y CCL20	Reclutamiento de células efectoras incluyendo células dendríticas y regulan la respuesta inmune
CXCL1, CXCL2, CXCL8 (IL-8), CXCL9, CXCL10 y CXCL11	Reclutamiento de células y regulan la respuesta inmune
<b>Otros</b>	
Oxido nítrico y radicales superóxido	Bactericida
Péptidos antimicrobianos	Bactericida

### 3.3 Activación de los mastocitos

Los mastocitos son células sensores del ambiente que los rodea, y responden a una diversidad de señales y estímulos, tanto inmunológicos como no inmunológicos, de una manera rápida y selectiva. La activación de los mastocitos puede ocurrir en respuesta a diversos estímulos, tales como la unión del receptor Fc $\epsilon$ RI con la IgE, componentes del complemento (C3a y C5a), cininas, neuropéptidos como sustancia P, péptidos endógenos como endotelina, o fuentes exógenas como toxinas derivadas de bacterias, (Wernersson & Pejler, 2014), tal como se muestra en la (figura 2).

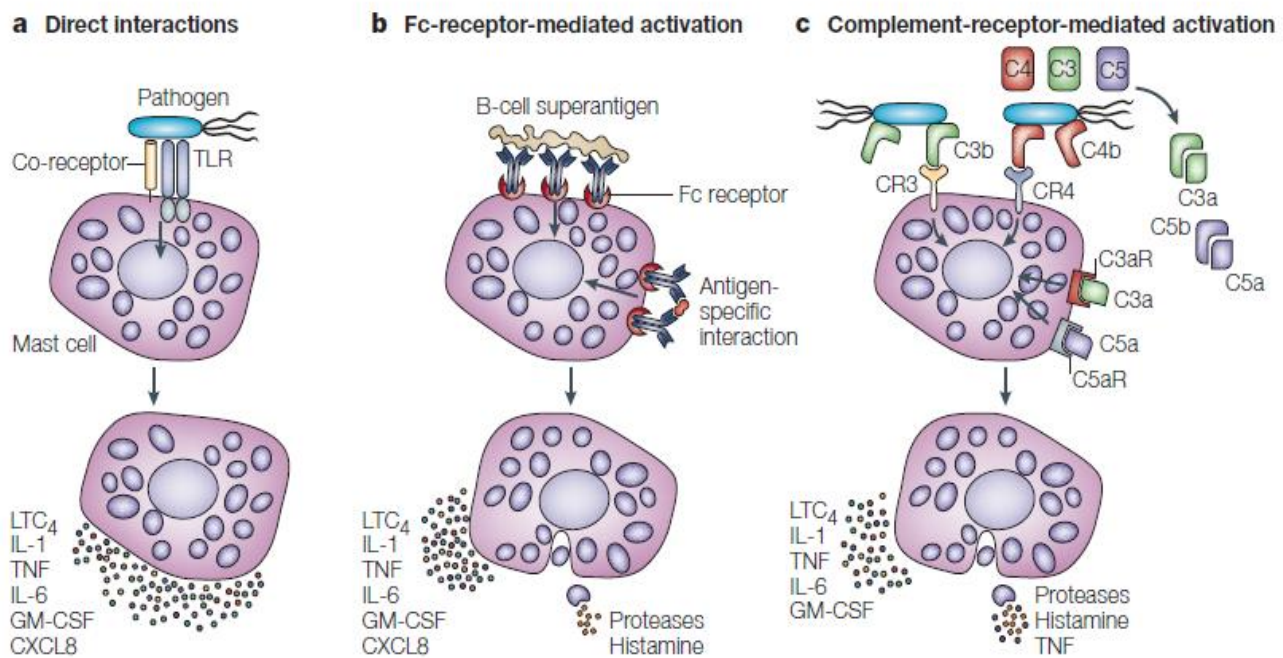


Figura 2 **Principales mecanismos de activación del mastocito por patógenos.** Los mastocitos se pueden activar tanto por mecanismos directos como indirectos, resultado de la exposición del huésped a patógenos. Las interacciones directas incluyen el receptor Toll-like (TLR) mediado por interacciones de receptores. Con frecuencia, la activación mediada por TLR no conduce a la desgranulación, aunque se ha informado sobre la producción de citocinas, quimiocinas y mediadores lipídicos. Ejemplos de activación indirecta incluyen activación mediada por receptor Fc (b) y activación mediada por receptor de complemento (c). Activación mediada por el receptor Fc conduce a la desgranulación de mastocitos y a la producción de múltiples mediadores. La Activación mediada por receptor-complemento de mastocitos puede ocurrir a través de varios receptores para componentes del complemento (como CR3, el receptor para el componente 3b del complemento, C3b) y receptores para productos divididos (tales como el C3aR, el receptor para C3a); sin embargo, la desgranulación parece ocurrir principalmente como resultado de la activación del receptor para C5a (C5aR).

Los mastocitos expresan una amplia variedad de receptores, entre los que se encuentran el receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI), importante en la respuesta alérgica y en la inmunidad frente a helmintos; receptores para el reconocimiento de patógenos o moléculas producidas por patógenos, así como receptores para moléculas del hospedero como el sistema del complemento y citocinas, entre otros (Marshall, 2004).

En los últimos años, se han estudiado una amplia gama de patógenos y sus productos asociados que pueden inducir la expresión selectiva de citocinas sin inducir degranulación. Es importante señalar que la capacidad de los mastocitos para responder a los patógenos se ve alterada por el microambiente de citocinas y quimiocinas (Marshall, 2004).

Receptores tipo Toll: A partir de estudios in vivo e in vitro en ratones ha sido evidente que los mastocitos interactúan con las bacterias y, lo más interesante es que puede contribuir a la defensa contra la infección bacteriana, mediante la liberación de TNF y otros mediadores requeridos para el reclutamiento de neutrófilos y otras células inmunes (Marshall, 2004).

El reconocimiento de patógenos por el mastocito puede ocurrir a través de los TLRs y, los resultados obtenidos en diversos estudios destacan que dependiendo de la fuente de obtención de la célula y las condiciones de cultivo, los mastocitos humanos podrán expresar TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7 y TLR9, pero no TLR5 (Marshall, 2004).

Curiosamente, la respuesta y lo que libere el mastocito por activación a través de TLR's será selectiva y diferente dependiendo del PAMP con el que interactúe (Soman & Ashley, 2010a)

Se ha demostrado que la activación FcεRI y la estimulación conjunta de TLR's en mastocitos, puede tener efectos sinérgicos en la producción de citocinas, aumentando la transcripción de dichas moléculas, a través de la actividad de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Soman & Ashley, 2010b)

Activación mediada por receptor Fc: Los mastocitos constitutivamente expresan varios receptores para inmunoglobulinas, que pueden ser selectivamente inducidos mediante la exposición de citocinas. Por ejemplo, por la exposición al IFN-γ, los mastocitos humanos suelen aumentar la expresión de los receptores FcεRI y FcγRII (receptor de mediana afinidad para IgG) (Marshall, 2004).



Los FcγRs mostrados en los mastocitos pueden contribuir a la activación de mastocitos de dos maneras: en un antígeno dependiente a través de la unión de anticuerpos específicos de patógenos o independientemente de anticuerpos específicos de patógenos a través de la acción de inmunoglobulinas derivadas de patógenos, también conocidas como superantígeno de células B (Figura 2) (Marshall, 2004).

La activación de los mastocitos vía agregación del FcεRI, por la unión de un alérgeno bivalente a la IgE, induce una respuesta de transducción de señales compleja, que da como resultado la degranulación del mastocito, que comprende la liberación inmediata (en segundos), por exocitosis, de mediadores preformados contenidos en sus gránulos, como la histamina, heparina, proteasas, y algunas citocinas, entre otras. Además, también ocurre la síntesis y liberación (en minutos) de derivados del ácido araquidónico (leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas); y la producción, con una cinética de tiempo prolongada, de diversas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Kawakami & Galli, 2002)

Activación mediada por factores del complemento: Muchas de las formas de infección o lesión tisular conducen a la activación de las vías del complemento, los mastocitos interactúan con el sistema del complemento a través del receptor 3 CR3(CD11b-CD18), receptor 4 CR4 (CD11c-CD18) y los receptores para el producto de C3a (C3aR) y C5a (C5aR), también conocido como CD88 (Nilsson *et al.*, 1996)

La cantidad expresada de CR3 y CR4 en mastocitos varía, según la localización, maduración y los efectos de citocinas locales. Por ejemplo, en humanos se observó la expresión de C5aR en mastocitos de la piel y el corazón, pero no por los mastocitos del útero, pulmones o las amígdalas (Füreder *et al.*, 1995)

La capacidad de los mastocitos para responder a productos del complemento proporciona mecanismos locales de defensa; C3a y C5a en ratones, han demostrado ser anafilotoxinas para mastocitos, esto puede fungir como una forma de reclutar mastocitos de forma selectiva (Marshall, 2004).

En los mastocitos de piel humana, las anafilotoxinas C3a y C5a, así como la sustancia P, funcionan como desencadenantes de la degranulación, por el contrario mastocitos de la mucosa de humanos no responden a estas moléculas (Bischoff, 2007)

Activación por factores de crecimiento y citocinas: Factores de crecimiento y citocinas particulares promueven el desarrollo de los progenitores de mastocitos y/o funcionan como reguladores en la liberación de mediadores. La más relevante es el Stem Cell Factor (SCF) que es el ligando de c-kit (CD117), un receptor con actividad tirosin-cinasa que se expresa en la superficie de todos los mastocitos, ya sea dependiente de la membrana o en forma soluble; promueve tanto el desarrollo, supervivencia, maduración y la adherencia de la matriz extracelular (ECM) en mastocitos (Bischoff *et al.*, 1999).

Además SCF puede regular la liberación de los mediadores del mastocito. Recientemente se ha descrito a la IL-4 como un regulador de mastocitos humanos. En contraste con el SCF, la IL-4 no afecta a los mastocitos por sí misma, pero funciona de forma sinérgica con el SCF, en la proliferación y supervivencia de mastocitos (Bischoff, 2007).

Otras sustancias que se han reportado como activadoras del mastocito, son los esteroides u hormonas sexuales. Diversos estudios han demostrado que los estrógenos, progesterona y testosterona, afectan la respuesta del mastocito, ya sea inhibiendo o aumentando la secreción de mediadores pro-inflamatorios (Guhl *et al.*, 2012; Vliagoftis *et al.*, 1990). El estradiol (E<sub>2</sub>) en particular, induce la liberación de histamina de manera directa en mastocitos, así como potencia la respuesta mediada a través de IgE (Muñoz-Cruz *et al.*, 2015).

Los mastocitos, además pueden ser activados por estrógenos ambientales provocando la degranulación de manera directa o independiente de IgE. Además, la combinación de concentraciones fisiológicas de E<sub>2</sub> y de estrógenos ambientales tiene efectos aditivos en la degranulación del mastocito. Así, los estrógenos ambientales contaminantes podrían promover alergias mediante la inducción y en la sensibilización en la degranulación de las células cebadas (Narita *et al.*, 2007). Los mastocitos expresan receptores a estrógenos alfa, nucleares y membranales. Por lo que, debe considerarse el posible impacto de los efectos de los estrógenos miméticos (con afinidad por estos receptores), presentes en el medio ambiente y en los alimentos, de manera natural o como contaminantes, en la activación del mastocito y en el desarrollo de enfermedades relacionadas a estas células (Muñoz-Cruz *et al.*, 2015).

### 3.4 Disruptores endocrinos

La capacidad que tienen algunos químicos sintéticos de interferir con el sistema hormonal humano se conoce desde los años 40. Sin embargo, el término disruptor endocrino, se acuñó en 1991, durante la Conferencia de Wingspread, donde un grupo de expertos en endocrinología, biología de la reproducción, toxicología, entre otros, se unieron para evaluar las causas de los efectos adversos observados en estudios epidemiológicos de personas y animales salvajes del Hemisferio Norte (Colborn, 1992). Los participantes propusieron la hipótesis de que los efectos adversos se debían a alteraciones del desarrollo embrionario y fetal de la exposición a contaminantes químicos, que denominaron disruptores endocrinos, expresando su preocupación sobre implicaciones en la salud pública y el medio ambiente de estos hallazgos (Romano, 2012).

El término disruptor endocrino define un conjunto diverso y heterogéneo de compuestos químicos exógenos, capaces de alterar la síntesis, liberación, transporte, metabolismo, enlace de acción o eliminación de las hormonas naturales en el organismo (Kavlock *et al.*, 1996). El catálogo de disruptores endocrinos crece día a día, comprendiendo desde productos químicos sintetizados por el hombre hasta sustancias que se encuentran de manera natural en el medio ambiente.

Conocer los mecanismos y modos de acción de los diferentes disruptores endocrinos es una de las prioridades de la investigación. En los últimos años se ha avanzado mucho y se han descrito diferentes formas por las que los disruptores endocrinos pueden alterar el equilibrio hormonal. Así hay sustancias disruptoras que pueden:

- ✓ Mimetizar la acción de las hormonas
- ✓ Antagonizar la acción de las hormonas
- ✓ Alterar su patrón de síntesis y metabolismo
- ✓ Modular los niveles de los receptores correspondientes, como el bisfenol A, que interfiere en el receptor estrogénico (Romano, 2012).

### 3.5 Bisfenol a (BPA)

El bisfenol A (2,2-bis(4-hidroxifenil)propano) (Figura 3) se obtiene por la condensación de dos moléculas fenol con una molécula de acetona en presencia de ácido clorhídrico (FitzGerald & Wilks, 2014). Fue sintetizado a principios del siglo XX, originalmente con la finalidad de ser un estrógeno sintético, debido a su acción sobre el útero de roedores. De hecho, el dietilestilbestrol, un análogo estructural, se encontró que era mucho más potente. Tiempo después, el BPA ha sido ampliamente utilizado por sus propiedades de entrecruzamiento, ya que el BPA se une con otra molécula para formar polímeros. (Dodds & Lawson, 1936)

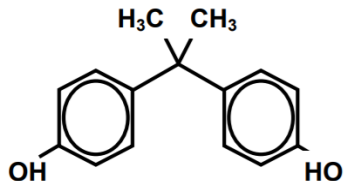


Fig 3. Estructura química del Bisfenol A

El BPA se utiliza fundamentalmente como monómero en la producción de plástico de policarbonato y resinas epoxi. El policarbonato se utiliza ampliamente en la fabricación de materiales en contacto con alimentos, como biberones, vajillas, utensilios de horno y microondas, envases de alimentos, botellas de agua, leche y otras bebidas, equipos de procesamiento y tuberías de agua. Las resinas epoxi se usan como revestimiento de protección de diversas latas de alimentos y bebidas, y como revestimiento de las tapas metálicas de jarras y botellas de vidrio, incluidos los envases de las preparaciones para lactantes (OMS, 2009)

Los científicos han descubierto que el BPA interacciona con los receptores de estrógenos, tanto en el núcleo como en la membrana celular, actuando como un antagonista de los receptores androgénicos y reduciendo la síntesis de algunos esteroides a nivel molecular (Wolstenholme *et al.*, 2011).

En todas las especies estudiadas, se ha visto que después de administración oral, el BPA se absorbía rápidamente en gran proporción (entre un 85-100% de la dosis administrada) en el tracto gastrointestinal. La absorción dérmica in vitro utilizando piel humana, resultó ser de aproximadamente un 10%. No hay datos toxicocinéticos del BPA después de exposición por inhalación, aunque se supone que la absorción será apreciable (OMS, 2009).

Atendiendo a la distribución en los tejidos después de administración oral, se ha observado que el BPA desaparece rápidamente de la sangre, ya que se observa efecto primer paso por el hígado, donde se metaboliza en gran parte. En ratas adultas sólo un 10-20% de la dosis administrada alcanza los tejidos (OMS, 2009)

Se ha encontrado la presencia de BPA en muestras humanas como orina, suero, sangre y saliva, los niveles de BPA dependerán del tipo de muestra ó el método de detección, aunque reportes repetidos indican que los niveles de BPA en humanos están en rangos nanomolares (Vandenberg *et al.*, 2007) Por ejemplo, los niveles típicos de BPA en suero y orina de adulto tienen un rango de 1-90nM y 5-10nM respectivamente (Vandenberg *et al.*, 2007)

### **3.6 Importancia de estudiar el impacto de los bisfenoles como disruptores endocrinos**

Cómo se mencionó anteriormente el BPA es una sustancia disruptiva endocrina estrogénica, es por esto que ha sido tema de estudio en los últimos años en donde se han realizado diversos estudios de los efectos que tiene en los animales y en los humanos. El BPA, se pueden absorber a través de diversas rutas tales como ingestión, inhalación y contacto con la piel en humanos y animales (Park & Lim, 2010).

Cuando el BPA alcanza por vía oral el organismo, se metaboliza en el hígado con mucha rapidez, convirtiéndose en un metabolito muy soluble: BPA-glucuronido (BPA-GLU) (Völkel, 2005). Una cantidad más pequeña de BPA, reacciona con sulfato dando lugar a BPA-Sulfato (Geens *et al.*, 2012). La conjugación del BPA se considera un proceso de desintoxicación (Matthews *et al.*, 2001), ya que este, se elimina de manera eficiente por la orina.

El BPA conjugado no presenta actividad estrogénica, por lo que cuando el BPA es metabolizado, sólo una pequeña cantidad de BPA libre puede unirse a los receptores estrogénicos (ER) produciendo la alteración hormonal y los consiguientes efectos adversos (Mileva et al., 2014). Se ha demostrado que el BPA puede unirse a varios receptores de hormonas nucleares, incluidos los receptores de estrógeno (ER) (Routledge *et al.*, 2000), el receptor de la hormona tiroidea (TR) (Zoeller *et al.*, 2005), peroxisoma proliferador activado receptor-g (PPAR-g) (Kwintkiewicz, 2010), receptor-g relacionado con estrógenos (ERR-g) (Matsushima *et al.*, 2007) ,y el receptor de pregnano X humano (PXR)(Sui *et al.*, 2012) , así como el receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER) (Dong *et al.*, 2011)

El BPA ha sido implicado en animales de laboratorio, como causa de trastornos reproductivos y desarrollo de anomalías que incluyen la disminución de producción de esperma, aumento de células proliferativas en cáncer de mama y estimulación de prolactina (Farabollini *et al.*, 1999; Takao, 1999).

Además se demostró que el BPA tiene la capacidad de modificar el epigenoma, cambiando la metilación del ADN, por consiguiente, se altera la transcripción de genes (Kundakovic & Champagne, 2011)

También se informó que el BPA puede perturbar el sistema inmune a través de una variedad de señales de citocinas, (Segura *et al.*, 1999) también pueden promover la producción de citocinas e inmunoglobulinas en macrófagos y células B *in vitro* (Hong *et al.*, 2004)

### **3.7 Mastocito y BPA**

Existen pocos estudios respecto al efecto directo del BPA en células del sistema inmunológico y la información del efecto que ejerce el BPA en los mastocitos es particularmente escasa. A la fecha solo existen 3 estudios, que se describen a continuación. El primero fue un estudio cuyo objetivo era ver el efecto de la exposición prenatal a BPA, en el desarrollo de las glándulas mamarias en ratas y en la susceptibilidad a un carcinógeno específico. Se observó que la exposición a BPA aumentaba las lesiones pre-neoplásicas en las mamas y que además, los animales expuestos a BPA presentaban un incremento en el número de

mastocitos en la glándula mamaria, el cual se asociaba con la formación de ductos hiperplásicos (Durando *et al.*, 2007). El segundo estudio reportó que la exposición *in vitro* de mastocitos murinos a BPA inducía la liberación de histamina y de leucotrienos, un efecto que no fue dependiente de receptores de estrógeno. Este estudio sugirió que la exposición a BPA a niveles a los que los humanos estamos expuestos puede provocar una respuesta inflamatoria aguda a través de la activación de los mastocitos (O'Brien *et al.*, 2013). El tercer estudio, reportó que mastocitos provenientes de ratones adultos que habían sido expuestos a BPA durante la etapa perinatal, mostraban un aumento en la respuesta inflamatoria mediada por IgE. Estos mastocitos presentaban una aumentada producción de IL-4, 5, 6, 13 y TNF- $\alpha$ , citocinas asociadas al asma. Adicionalmente, los mastocitos de los ratones expuestos a BPA presentaban un aumento en la metilación global de ADN, lo que indicaba el potencial del BPA en la desregulación de las funciones de estas células (O'Brien *et al.*, 2013b)

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En el mundo moderno, la población está expuesta diariamente a cientos de contaminantes químicos, entre los que se encuentran los denominados compuestos disruptores endocrinos, químicos que pueden interferir o mimetizar la actividad de las hormonas, ocasionando diferentes daños en la salud (De Coster & van Larebeke, 2012). El bisfenol A (BPA), es un monómero presente en plásticos y resinas, es el de mayor interés porque tiene un alto potencial de exposición humana (Durando *et al.*, 2007)

Diversos estudios han encontrado que la exposición al BPA, no solo tiene efectos dañinos en el aparato reproductivo, sino que también tiene efectos negativos en el sistema inmunológico. Estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que el BPA puede alterar el funcionamiento de las células del sistema inmune, una de estas células son los mastocitos. Científicos mencionan que la interacción entre el BPA y los mastocitos, puede contribuir a la patogénesis y gravedad del asma, esto se debe a que el BPA tiene la capacidad de aumentar la degranulación del mastocito (O'Brien *et al.*, 2013). De igual manera se ha demostrado que la exposición de BPA en edad perinatal en ratones, tiene una influencia a largo plazo en la respuesta de los mastocitos, regulada por la producción de mediadores pro-inflamatorios

asociados con el asma y los niveles globales de metilación del ADN. Estos estudios sugieren el potencial del BPA para la desregularización de la respuesta de los mastocitos, contribuyendo a la inflamación pulmonar alérgica asociada con enfermedades de las vías aéreas en la edad adulta (O'Brien et al., 2013).

Aunque en los últimos años se han realizado cientos de estudios *in vitro* e *in vivo* para demostrar los diferentes efectos dañinos del BPA, los estudios respecto al efecto directo del BPA en células del sistema inmunológico humano son pocos. Concretamente, la información de los efectos del BPA en la respuesta de mastocitos humanos, es casi nula. Dado el papel relevante del mastocito en diversos procesos inmunológicos y en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, resulta interesante estudiar los efectos del BPA en la activación de mastocitos humanos, así como la producción de mediadores inflamatorios de respuesta inmediata (degranulación) y tardía (síntesis de *novo*), involucrados en el desarrollo de enfermedades inflamatorias.

El siguiente trabajo de tesis experimental tiene la finalidad de estudiar el efecto de la exposición *in vitro* de diferentes concentraciones de bisfenol A en mastocitos humanos (LAD2), para comprender la capacidad de estos compuestos de alterar la producción de mediadores inflamatorios de respuesta inmediata (degranulación) y tardía (síntesis de *novo*) de los mastocitos.



## 5. HIPÓTESIS

Al estimular mastocitos humanos (LAD2) con bisfenol A, se propiciará la liberación de mediadores como TNF- $\alpha$ , así como la síntesis de novo de mediadores: triptasa, quimasa, IL-4, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y VEGF

## 6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la exposición de BPA produce la degranulación de mastocitos humanos (LAD2) la cual será evaluada mediante la determinación de la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa, TNF- $\alpha$  y síntesis de *novo* de mediadores (triptasa, quimasa, IL-4, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y VEGF), con la finalidad determinar si existe algún estímulo de dichas células frente al BPA.

## 7. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa en mastocitos humanos (LAD2) mediante la estimulación de diferentes concentraciones de BPA, para evaluar si fomentó la degranulación de dichas células.
- ✓ Detectar si se fomenta la degranulación en mastocitos humanos (LAD2) después de la estimulación con diferentes concentraciones de BPA, con la cuantificación de la liberación de TNF- $\alpha$  mediante la técnica de ELISA sándwich.
- ✓ Conocer si el BPA fomenta en mastocitos humanos (LAD2) la síntesis de *novo de* mediadores mediante el aumento de la expresión de los genes de triptasa, quimasa, IL-4, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y VEGF los cuales se determinarán con la RT-PCR.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Cultivo celular de mastocitos humanos (LAD2)

Los cultivos celulares de mastocitos humanos son de difícil acceso, debido a la complejidad de obtener un número significativo de mastocitos en los cultivos primarios, aunando a esto también existía la dificultad de que los cultivos de mastocitos no sobrevivían a largo plazo (Kirshenbaum et al., 2003). La única línea celular que existía era la HMC-1 (Human Mast Cell 1), derivada de un paciente con leucemia de mastocitos; sin embargo estas células presentan deficiencias que limitan su utilidad, tienen mutaciones en la secuencia que codifica C-Kit (está permanentemente fosforilado) presentan gránulos escasos y además carecen de un receptor funcional de IgE (Sundstrom et al., 2003).

En el año 2000 se logró aislar nuevas líneas celulares de mastocitos humanos denominados LAD1 y LAD2, las cuales se obtuvieron de sangre de médula ósea de un paciente masculino que presentaba sarcoma de mastocitos/leucemia. Las células LAD1 y LAD2 tienen las características ultraestructurales de los mastocitos humanos maduros, contienen abundantes gránulos y expresan un FcεRI funcional, además, contienen histamina, triptasa y quimasa. La disponibilidad de estas líneas celulares ofrece una circunstancia sin precedentes para examinar la biología de los mastocitos humanos (Kirshenbaum et al., 2003).

Los mastocitos humanos LAD2, fueron cultivados en medio libre de suero (StemPro®-34 SFM, Life technologies, Gibco), suplementado con 2mM de GlutaMAX, 2mM de Antibiótico/Antimicótico y 100µg/mL de SCF humano recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Las células fueron mantenidas en cajas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> en una densidad mínima de 200 mil células/mL y máxima de 400 mil células/mL, incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue remplazado semanalmente por hemidepleción.

## 8.2 Determinación de liberación de $\beta$ -hexosaminidasa

La  $\beta$ -hexosaminidasa es una enzima contenida en los gránulos citoplasmáticos de los mastocitos, el nivel de esta enzima liberada en el sobrenadante proporciona una indicación del grado de proceso de degranulación que ocurre inmediatamente después de la activación de los mastocitos (Yu *et al.*, 2016).

Se utilizaron 15 000 células LAD2 por ensayo, realizando triplicados por tratamiento, las células se colocaron en microtubos de 0.6mL, siendo resuspendidas en 50 $\mu$ L de HTB (Hepes Tyrodes Buffer), se agregó 50 $\mu$ L de los estímulos correspondientes, teniendo un volumen final de 100 $\mu$ L; para los controles positivos se utilizó el compuesto activador C48/80 a una concentración de 1 $\mu$ g/mL; se utilizó un control basal al que solamente se añadió regulador HTB (Hepes Tyrodes Buffer) a las células tratadas se añadió bisfenol A, a concentraciones crecientes (25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M,)<sup>1</sup> se incubaron durante 30min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente se centrifugó los microtubos a 3400rpm por 5min; se separó los sobrenadantes en microtubos de 0.5mL; por otro lado se lisan las pastillas con 100 $\mu$ L de Triton X-100 al 0.5%.

Por último se colocó 20 $\mu$ L de los sobrenadantes y 20 $\mu$ L de la pastilla en diferentes pozos de una placa de ELISA, se añadió a cada pozo 50 $\mu$ L de sustrato de utilizado P-nitrofenil N-acetil-beta-D-glucosamina, se incubó a 37°C por 90min, posteriormente de para la reacción añadiendo 150 $\mu$ L de glicina 0.2M, pH 10.7. Los niveles de  $\beta$ -hexosaminidasa en sobrenadantes y en los lisados celulares, fueron determinados por un ensayo colorimétrico; en donde el sustrato utilizado P-nitrofenil N-acetil-beta-D-glucosamina reacciona con la

---

<sup>1</sup> La concentración de BPA de 50 $\mu$ M se tomó como referencia del artículo (Shim JU & Lim, 2009), ya que trabajaron con ensayos de degranulación en la línea celular de mastocitos humanos (HMC-1); por ahora, la literatura no reporta ensayos de degranulación en LAD2 después de la estimulación con BPA, por lo que las concentraciones de 25 $\mu$ M y 100 $\mu$ M se propusieron para conocer la respuesta a concentraciones inferiores y superiores.

hexosaminidasa presente, formando una sustancia colorida 4-P-nitrofenol la cual se lee a 405nm.

Los porcentajes de  $\beta$ -hexosaminidasa se calcularon utilizando la siguiente formula

$$\left( \frac{\textit{lectura del sobrenadante}}{\textit{lectura del sobrenadante} + \textit{lectura de pastilla}} \right) \times 100$$

### **8.3 Determinación de TNF- $\alpha$ mediante ELISA sándwich**

Se colocaron 200 mil células LAD2 por pocillo, incubándolas durante 24 horas a 37°C/5% CO<sub>2</sub> con diferentes concentraciones de BPA (25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M)<sup>2</sup>, se colocó como control positivo C48/80.

Se centrifugó la placa de cultivo, tomando el sobrenadante libre de células, para la cuantificación de TNF- $\alpha$ , mediante el kit de ELISA (PEPROTECH) según las instrucciones del fabricante (Anexo 1)

El rango de detección para TNF-  $\alpha$  fue de 16-2000pg/mL.

### **8.4 Determinación del efecto del BPA en la expresión de genes en mastocitos humanos (LAD2)**

Para cuantificar mediante la técnica de PCR punto final, el efecto que provoca El BPA en la síntesis de *nov*o de triptasa, quimasa, TNF- $\alpha$ , VEGF, IL-4, IL-8 y TGF- $\beta$  en mastocitos humanos (LAD2), se llevó a cabo una estimulación de los mastocitos a diferentes concentraciones de BPA

Se utilizó una placa de cultivo de 6 pozos, en donde se depositaron 2X10<sup>6</sup> células LAD2, en un volumen final de 2mL de medio Stem-Pro con 50% de suplemento y sin SCF. Se colocó

---

<sup>2</sup> Las concentraciones de BPA (25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M) propuestas en la cuantificación de TNF- $\alpha$ , fueron iguales al ensayo de la estimación del porcentaje de la liberación de beta-hexosaminidasa.

por pozo, un control basal y concentraciones finales de BPA (100nM, 25µM, 50µM y 100µM)<sup>3</sup>; se incubó la placa por 24 horas a 37°C con una concentración 5% de CO<sub>2</sub>.

## 8.5 Extracción y cuantificación de RNA

El dogma central de la biología molecular, describe el flujo de la información para la expresión de la información hereditaria, en donde dice que el DNA se transcribe en RNA, para dar origen a proteínas (Koolman & Röhme, 2012). La biología molecular se ha encargado de aplicar técnicas para determinar la expresión de genes en base al dogma central de la biología molecular, un claro ejemplo es la q-PCR (PCR en tiempo real). La q-PCR comprende dos procesos, primeramente una transcripción inversa, que a partir de ácido ribonucleico (ARN) sintetiza ADN complementario (ADNc), con el cual se realiza posteriormente la(s) PCR(s) correspondiente(s) (Díaz, 2013).

La extracción de RNA de mastocitos estimulados se llevó a cabo con el kit RNeasy Minikit de QIAGEN® (Anexo 2), el cual se fundamenta en las propiedades de enlace selectivo del ácido ribonucleico (RNA) a una membrana de sílice contenida en una columna. En primer lugar las muestras son lisadas y homogenizadas en presencia del buffer de tiocianato de guanidina, este buffer también tiene la capacidad de conservar la integridad del RNA mediante la inhibición de las RNAsas. Se añade etanol para proporcionar condiciones de enlace apropiado, y a continuación la muestra se aplica en una columna RNeasy, donde el RNA total se une a la membrana de sílice y los contaminantes son arrastrados de forma eficiente; finalmente el RNA es eluido en 30µL de agua libre de RNAsas para su posterior cuantificación. La cuantificación del RNA de cada muestra se llevo a cabo mediante el uso de NanoDrop®, el cual es un espectrofotómetro de espectro total (220-750nm).

---

<sup>3</sup> En base a los resultados obtenido en el artículo (Ptak & Gregoraszczyk, 2015) en donde obtienen una expresión significativa para el gen VEGF a una concentración de BPA de 100nM, en líneas celulares que derivan de cáncer de ovario, es por esto que se propuso conocer el comportamiento de la expresión de los genes correspondientes, en células LAD2 a concentraciones de BPA (100nM, 25µM, 50µM y 100µM)

## **8.6 Síntesis de ADN complementario (cDNA)**

Dado que el RNA es de solo una hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa, antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de ADN complementaria (cDNA), la cual es más estable al calor.

La síntesis de cDNA a partir de RNA se realizó mediante el kit RevertAid first strand de Thermo Fisher Scientific (Anexo 3), el cual utiliza una retrotranscriptasa (RT) y un M-Mult RT recombinante que mantiene la actividad de la enzima a 42-50°C, y es adecuado para la síntesis de cDNA hasta 13 Kb.

RiboLock RNase inhibitor protege eficazmente las plantillas de RNA de la degradación, los oligos dT se alinean selectivamente a la cola de poli(A) del mRNA. La reacción se lleva a cabo a 40°C por 60min y se termina a 70°C por 5min para inactivar la enzima retrotranscriptasa; una vez finalizada la reacción los productos de síntesis se conservan a -20°C, para su posterior análisis de expresión génica mediante la RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, 2015).

## **8.7 Amplificación de cDNA por PCR tiempo final (RT-PCR)**

La PCR en tiempo real fue desarrollada con la finalidad de cuantificar la diferencia en la expresión del mRNA, con ayuda de un sistema de detección. La detección y cuantificación de un reportero cuya actividad de fluorescencia (SYBR Green), aumenta en proporción directa a las cantidades de producto de PCR en la reacción. El término, tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción, por otra parte el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra (de Dios, 2013). Con ayuda de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra.

Se realizó una dilución del cDNA obtenido 1:3 con agua libre de endonucleasas, se utilizó El kit q-RT-PCR Light Cycler 480 SYBR Green Master 2x de la marca Roche (Anexo 4); que utiliza el colorante SYBR Green la cual es una molécula cargada positivamente que tiene gran afinidad al DNA bicateriano, uniéndose en el surco menor del ADN; este intercalamiento ocasiona que el SYBR Green se oxide y emita fluorescencia. El aparato de RT-PCR detecta esta fluorescencia y el software calcula los valores de intensidad de fluorescencia. La intensidad de esta florescencia es proporcional al número de copias del ADN blanco. El termociclador que se usó para la PCR tiempo real fue el Lightcycler480 (Roche).

La amplificación del ADN se logra usando secuencias cortas de ADN específico complementario (cDNA) al gen de interés, conocidos como iniciadores o primers y la ADN polimerasa (Cano, 2017). Los iniciadores usados en este proyecto (se muestran en la tabla 3) fueron diseñados por la Doctora Samira Muñoz Cruz, usando el programa Primer-Blast, del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI, NLM, NIH U.S)

**Tabla 3: Características de los iniciadores usados en la RT-PCR**

<b>Genes</b>	<b>Secuencia sentido</b>	<b>Secuencia anti-sentido</b>
<b>h GAPDH</b>	5'-CTT CAC CAC CAT GGA GAA GGC-3'	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'
<b>h Quimasa</b>	5'-ACTTCCAACGGTCCCTCAAA-3'	5'- CCTCAAGCTTCTGCCATGTG-3'
<b>h Tripatasa</b>	5'-CAG TGG GTG CTG ACC-3'	5'-GCA GTT GCA CCC TGA GGG-3'
<b>h IL-4</b>	5'-CTC CAA GAA CAC AAC TGA GAA-3	5'-ACT CTG GTT GGC TTC CTT CA-3'
<b>h IL-8</b>	5'-AAG AGA GCT CTG TCT GGA CC-3'	5'-GAT ATT CTC TTG GCC CTT GG-3'
<b>h TNF-α</b>	5'-CAG CCT CTT CTC CTT CCT GAT-3'	5'-GCC AGA GGG CTG ATT AGA GA-3'
<b>h TGF- β</b>	5'-GGC CTT TCC TGC TTC TCA TGG-3'	5'-CCT TGC TGT ACT GCG TGT-3'
<b>h VEGF</b>	5'- GCACCCATGGCAGAAGG -3'	5'- CTCGATTGGATGGCAGTAGCT-3'

Los datos obtenidos de la RT-PCR, fueron exportadas a una hoja de cálculo diseñada por la Doctora Samira Muñoz; estos datos fueron analizados de acuerdo al método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$

La expresión de los genes de interés fue normalizada respecto a la expresión constitutiva de GAPDH. El cambio en la expresión relativa de los genes de interés se llevo a cabo comparando su expresión en mastocitos no estimulados (basal) con la expresión en mastocitos estimulados con las diferentes concentracion de BPA, dichas comparaciones re realizaron con el método CT comparativo dónde:

$$\Delta CT = (CT_{gen\ blanco} - CT_{gen\ constitutivo\ GAPDH})$$

$$\Delta\Delta CT = (\Delta CT_{muestra\ tratada} - \Delta CT_{muestra\ basal})$$

Posteriormente el valor obtenido se coloca como exponente en la siguiente fórmula

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

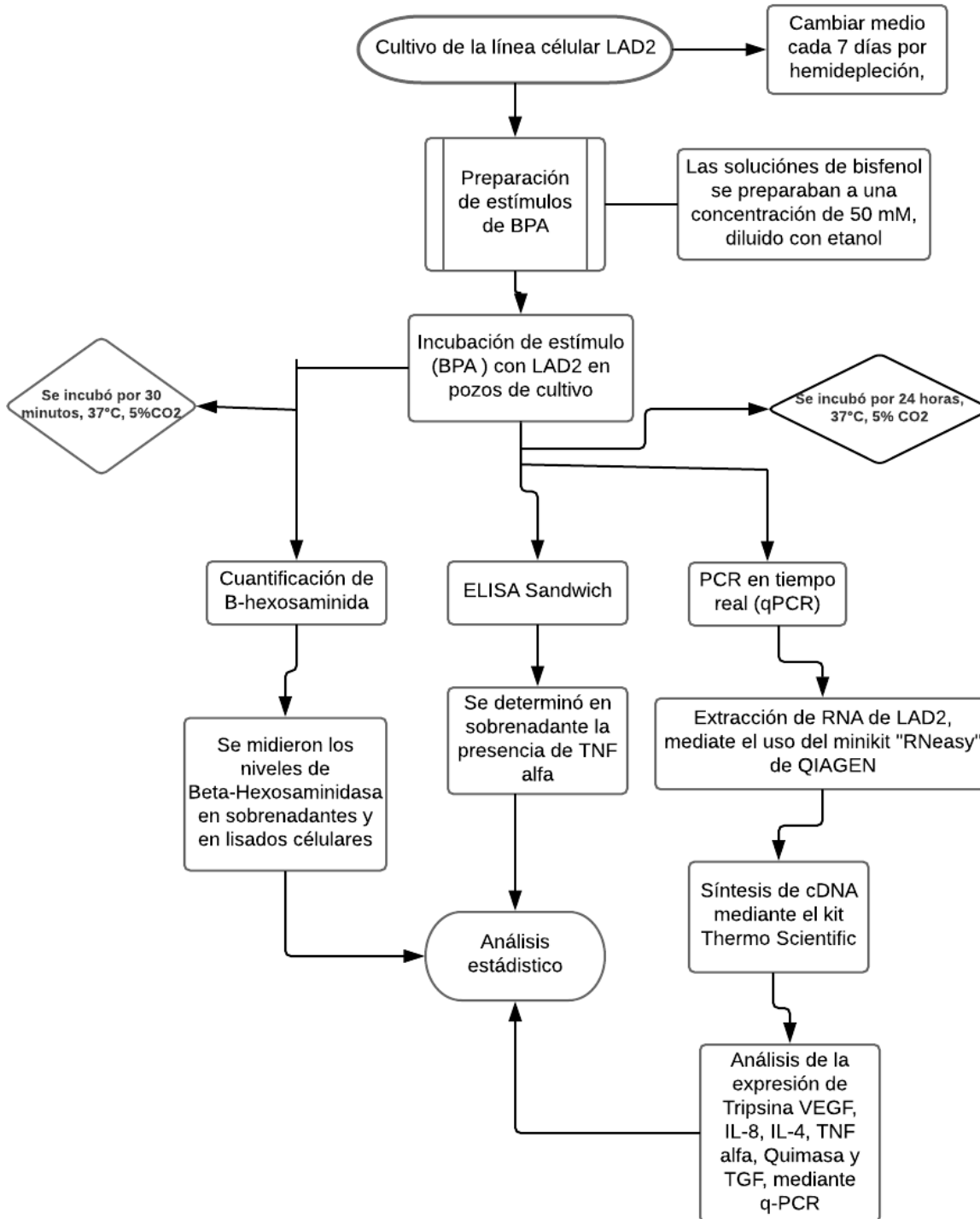
## 8.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba de análisis de varianza ANOVA, donde nos permite identificar si existen diferencias significativas entre el control basal y las células estimuladas con diferentes concentraciones de BPA. En donde se considero  $P < 0.05$  como estadísticamente significativo.

Los análisis se realizaron con ayuda del programa GraphPad Prism 6®



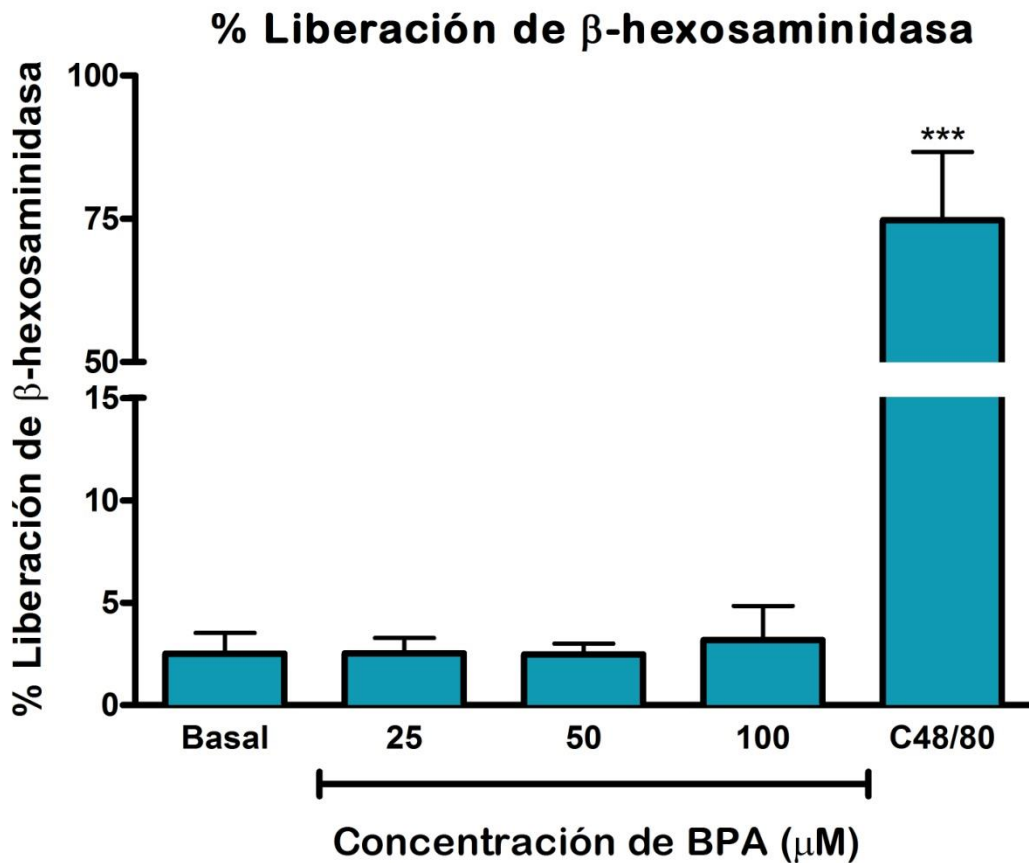
## 9. DIAGRAMA GENERAL DEL TRABAJO



## 10. RESULTADOS

### 10.1 Cuantificación de la liberación de $\beta$ -hexosaminidasa

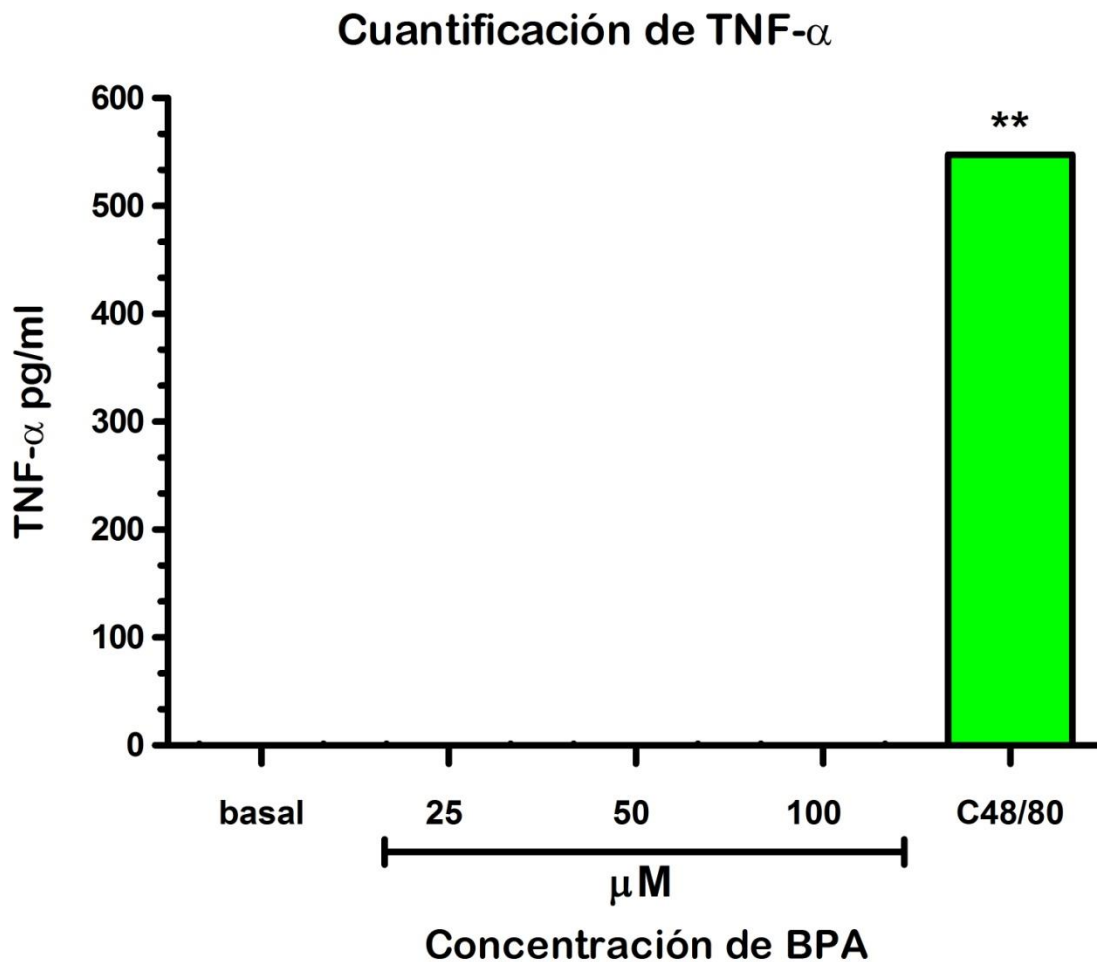
En los mastocitos humanos estimulados con diferentes concentraciones de BPA, no se observó una liberación significativa de  $\beta$ -hexosaminidasa ( $***P<0.05$ ), comparada con respecto a las células sin estímulo (basal), de igual manera se observó que el control positivo C48/80 indujo una liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa mayor al 70 %, la cual fue significativa (Figura 4)



**Fig. 4 Cuantificación de la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa en mastocitos humanos (LAD2)** estimulados 30 minutos con diferentes concentraciones de BPA (25 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ ); se analizó el porcentaje de la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa. La liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa sin estímulo (basal) y estimulada con C48/80 (1 $\mu\text{g/ml}$ ) fueron incluidas como controles, los valores obtenidos fueron comparados con el control basal. Los valores mostrados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.  $***p<0.001$  respecto a la liberación basal.

## 10.2 Cuantificación de TNF- $\alpha$ en mastocitos humanos (LAD2) mediante ELISA sándwich

El BPA no estimuló la liberación de TNF- $\alpha$  en el mastocito, en ninguna de las concentraciones usadas; se utilizó como control positivo C48/80, el cual si indujo la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 5)

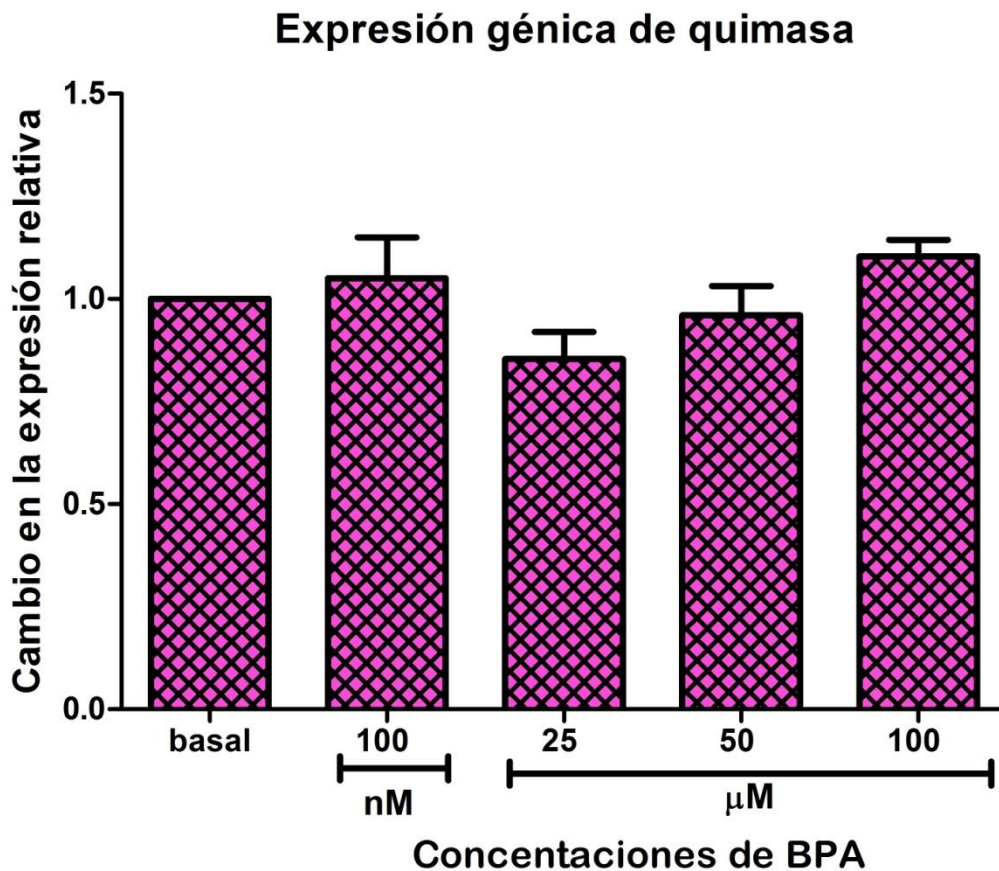


**Fig. 5 Determinación de TNF- $\alpha$  en mastocitos humanos (LAD2) mediante ELISA Sandwich** estimulados 24 horas, con diferentes concentraciones de BPA (25 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ ); se determinó la concentración de TNF- $\alpha$ , liberada por los mastocitos. La determinación TNF- $\alpha$  en mastocitos sin estímulo (basal) y estimulada con C48/80 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) fueron incluidas como controles, los valores obtenidos fueron comparadas con el control basal. Los valores mostrados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*\* $p < 0.01$  respecto a la liberación basal.

Se realizó la cuantificación relativa de los niveles de expresión de genes para la síntesis de *novo* de mediadores de mastocitos humanos, los cuales se activan al responder a ciertos estímulos, en estos experimentos se estimuló a mastocitos humanos (LAD2) con diferentes concentraciones de BPA. Se obtuvieron los siguientes resultados.

### 10.3 Expresión génica de quimasa

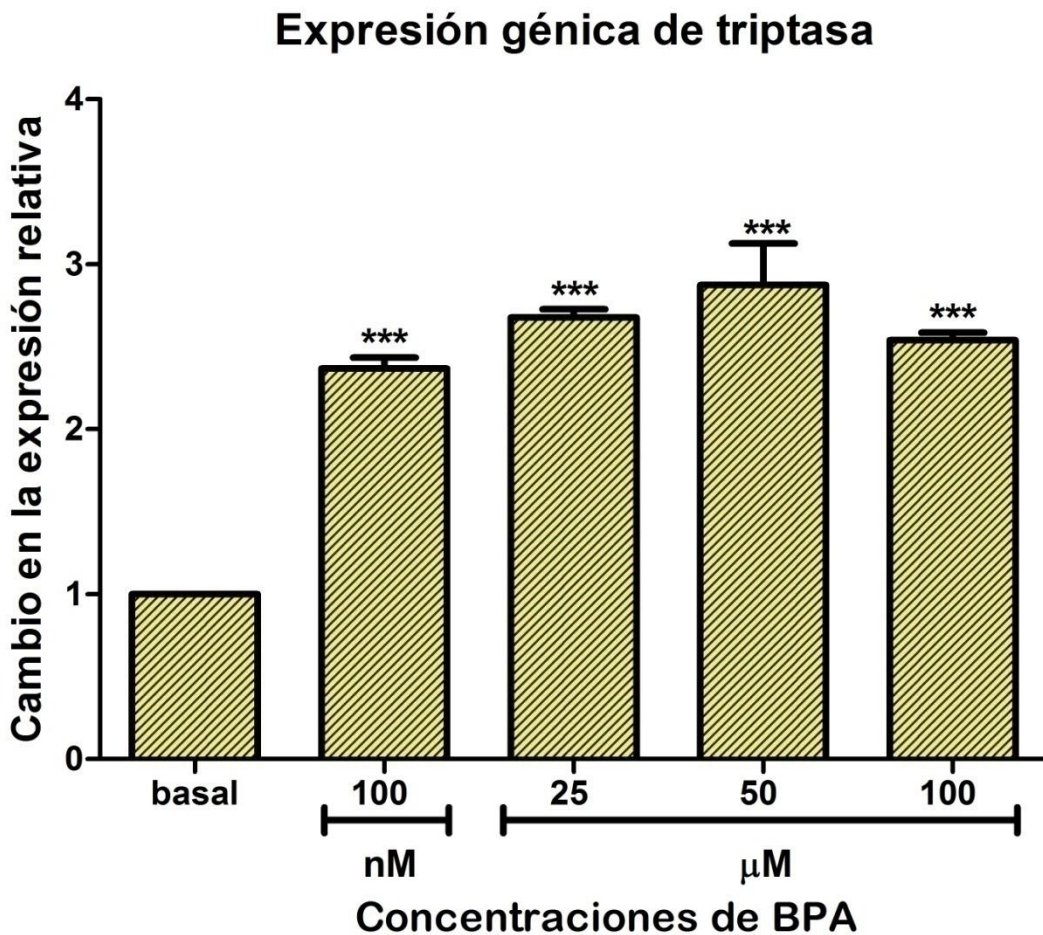
La expresión del gen que codifica para quimasa en mastocitos humanos, no mostró una diferencia significativa al estimular las células con diferentes concentraciones de BPA, en comparación con las células sin estímulo (basal) (Figura 6)



**Fig. 6 Expresión génica de quimasa en LAD2**, al ser estimuladas durante 24 horas con diferentes concentraciones de BPA. Los valores obtenidos fueron comparados con la expresión basal. Los valores mostrados son el promedio de  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado

## 10.4 Expresión génica de triptasa

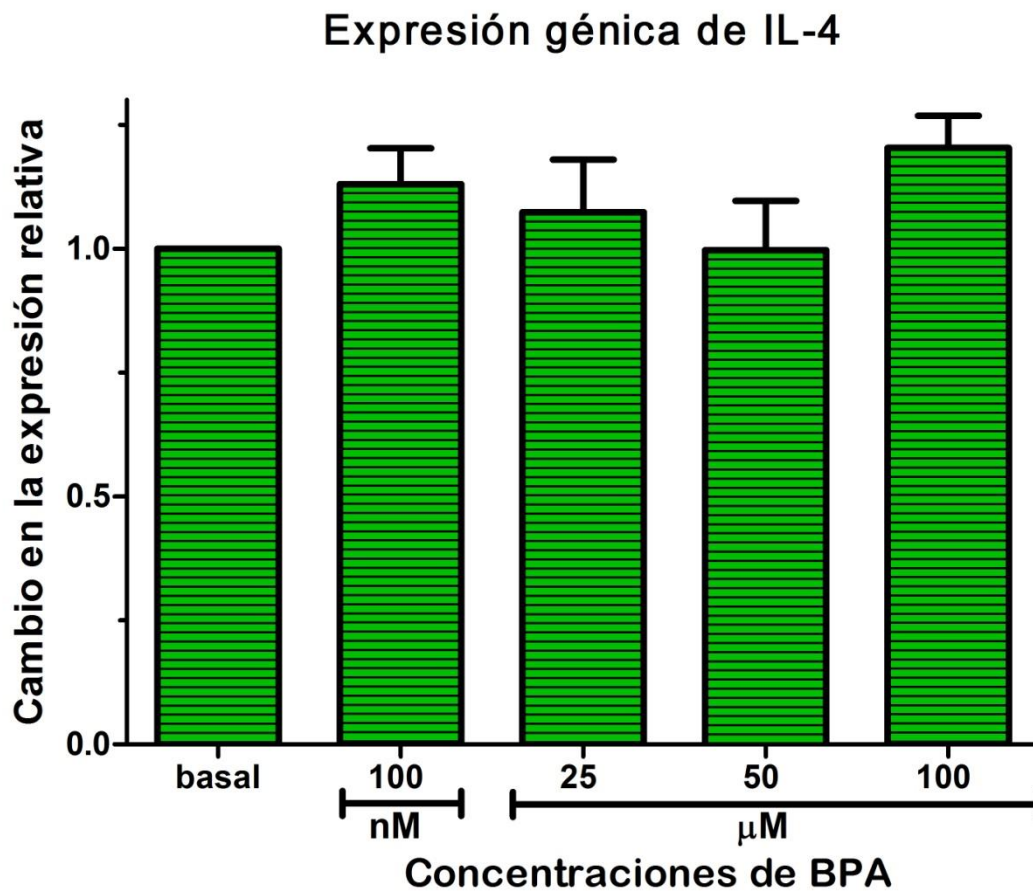
Los niveles de expresión del gen que codifica para triptasa en mastocitos humanos, aumentó de manera significativa ( $***P<0.001$ ) en comparación con las células sin estímulo (basal) en todas las concentraciones de BPA utilizadas (Figura 7).



**Fig 7. Expresión génica de triptasa en LAD2**, al ser estimuladas durante 24 horas con diferentes concentraciones de BPA. Los valores obtenidos fueron comparados con el control basal,  $***P<0.001$ . Los valores mostrados son el promedio de  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

## 10.5 Expresión génica de IL-4

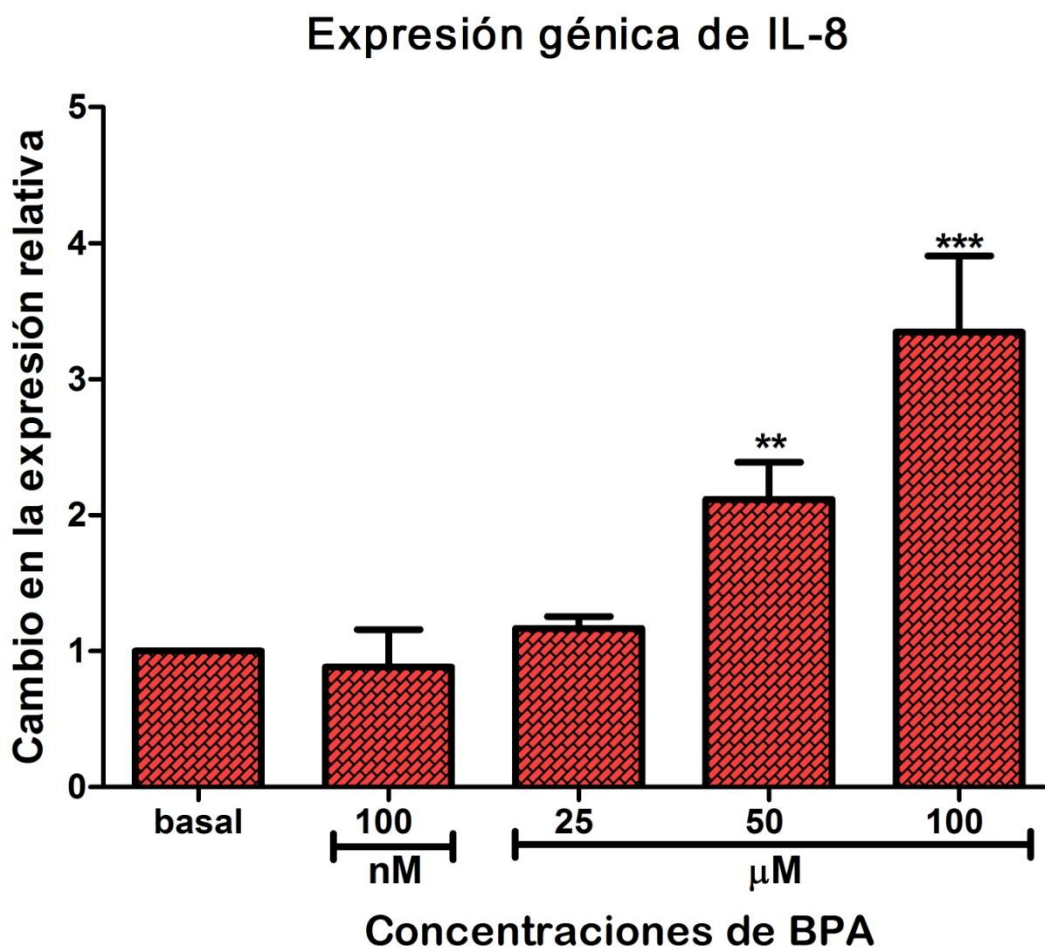
La estimulación de los mastocitos con diferentes concentraciones de BPA no indujo cambios en la expresión del gen que codifica para IL-4 en comparación con las células sin estímulo (basal) (Figura 8)



**Fig. 8 Expresión génica de IL-4 en LAD2**, al ser previamente estimuladas 24 horas con diferentes concentraciones de BPA. Los valores obtenidos fueron comparados con el control basal. Los valores mostrados son el promedio de  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado

## 10.6 Expresión génica de IL-8

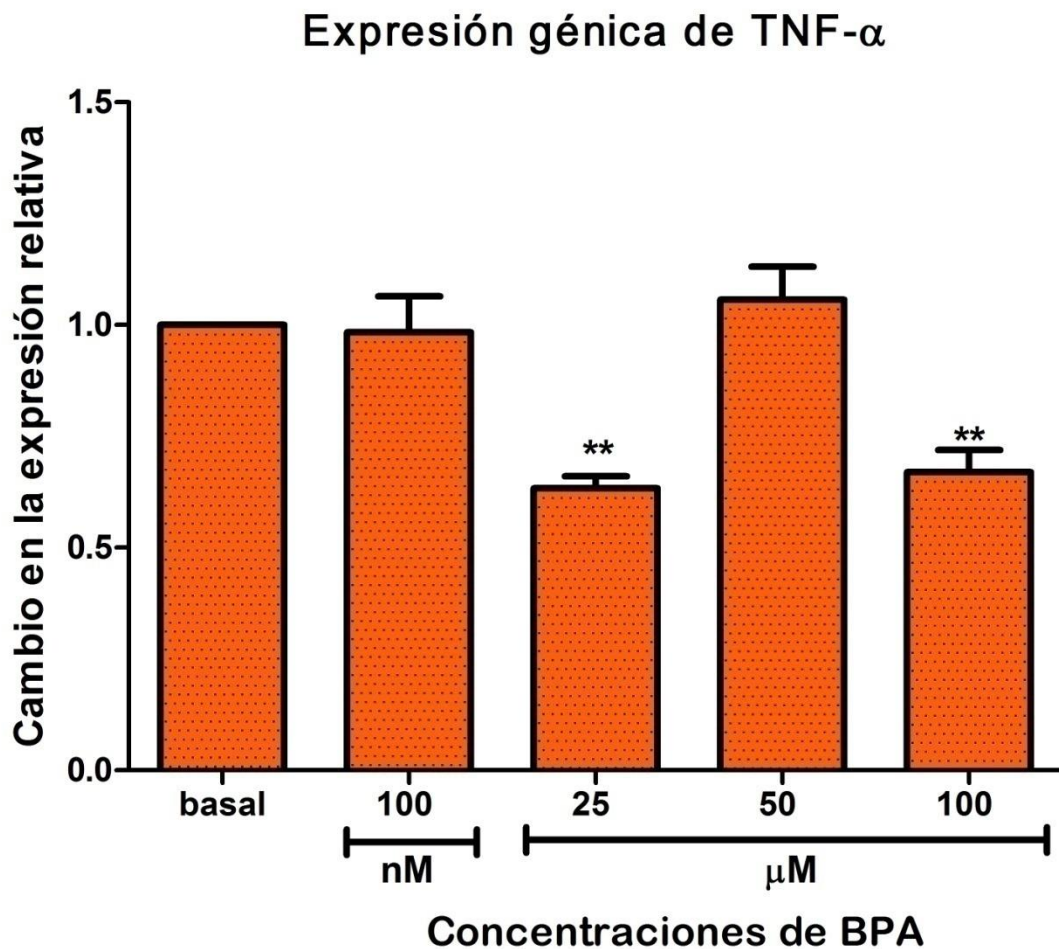
La expresión del gen que codifica para IL-8, en mastocitos humanos se vio aumentada de manera significativa en mastocitos estimulados con BPA a concentraciones de 50 $\mu$ M (\*\*P<0.01) y 100 $\mu$ M (\*\*P<0.001) en comparación con las células sin estímulo (basal), mientras en las concentraciones restantes no existió una diferencia significativa (Figura 9).



**Fig 9. Expresión génica de IL-8 en LAD2**, al ser estimuladas durante 24 horas con diferentes concentraciones de BPA. Los valores obtenidos fueron comparados con el control basal. Los valores mostrados son el promedio de  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado

## 10.7 Expresión génica de TNF- $\alpha$

La expresión del gen que codifica para TNF- $\alpha$  en mastocitos humanos, sólo mostró disminución de manera significativa (\*\*P<0.01) en mastocitos estimulados con BPA a las concentraciones de 25 $\mu$ M y 100 $\mu$ M, en comparación con las células sin estímulo (basal); mientras que en las concentraciones restantes no se observó una diferencia significativa

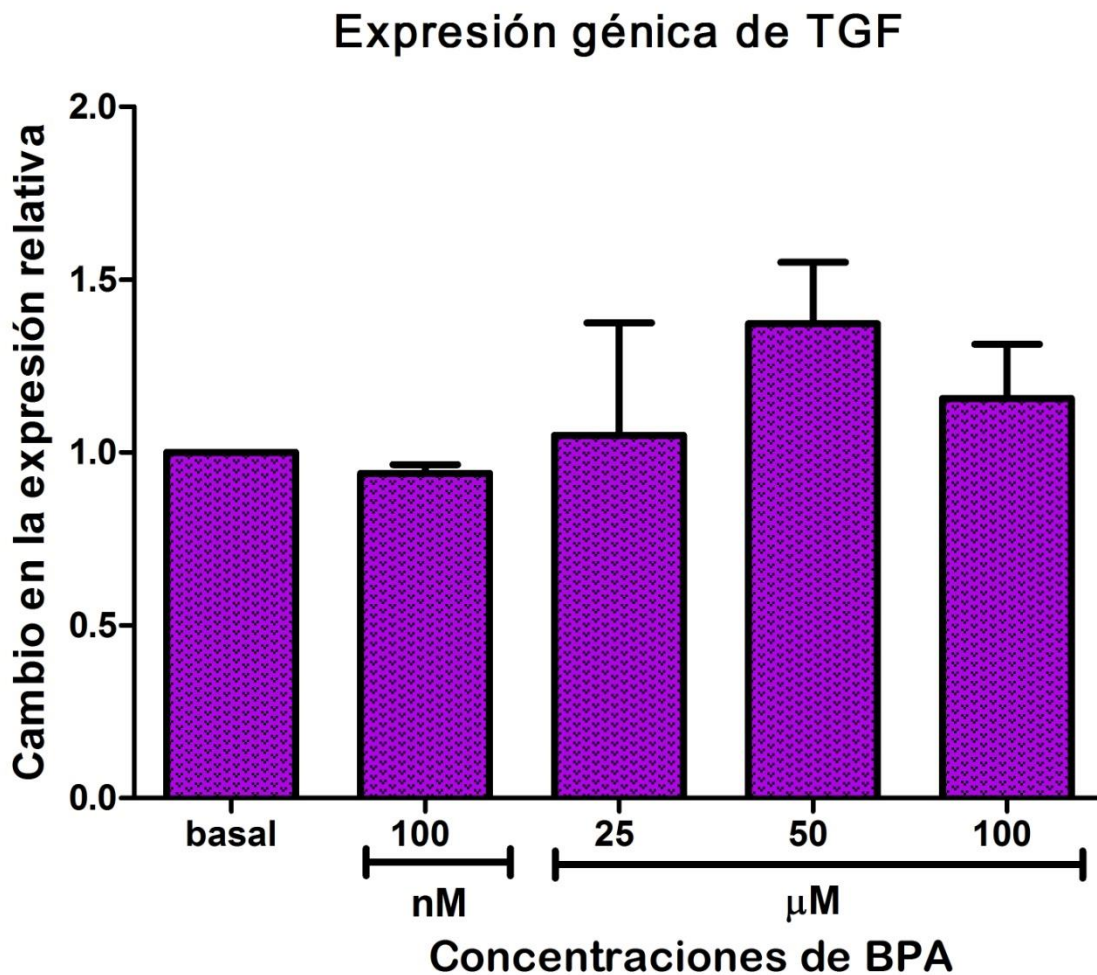


**Fig10. Expresión génica de TNF- $\alpha$  en LAD2**, al ser estimuladas durante 24 horas con diferentes concentraciones de BPA. Los valores obtenidos fueron comparados con el control basal. Los valores mostrados son el promedio de  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado



## 10.8 Expresión génica de TGF- $\beta$

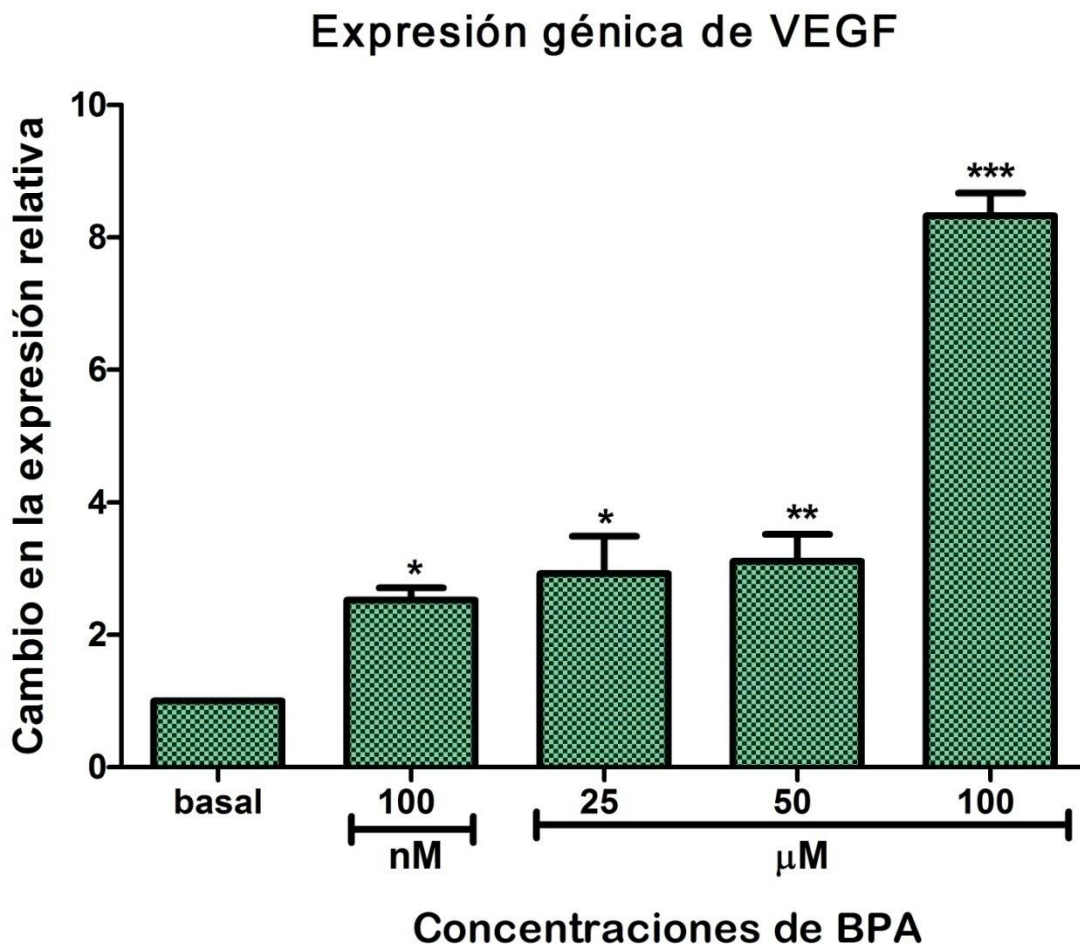
La expresión del gen que codifica para TGF- $\beta$  en mastocitos humanos, no mostró diferencia significativa en mastocitos estimulados con las diferentes concentraciones de BPA, en comparación con las células sin estímulo (basal), (Figura 11).



**Fig 11. Expresión génica de TGF en LAD2**, al ser estimuladas durante 24 horas con diferentes concentraciones de BPA. Los valores obtenidos fueron comparados con el control basal. Los valores mostrados son el promedio de  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado

## 10.9 Expresión génica de VEGF

La expresión del gen que codifica para VEGF en mastocitos humanos, se vio aumentada de manera significativa en mastocitos estimulados con BPA a concentraciones de 100 nM (\*P<0.05), 25  $\mu$ M (\*P<0.05), 50  $\mu$ M (\*\*P<0.01) y 100  $\mu$ M (\*\*P<0.001) en comparación con las células sin estímulo (basal) (Figura 12).



**Fig 12. Expresión génica de VEGF en LAD2**, al ser estimuladas durante 24 horas con diferentes concentraciones de BPA. Los valores obtenidos fueron comparados con el control basal. Los valores mostrados son el promedio de  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

## 11. DISCUSIÓN

Los mastocitos son células importantes en la defensa que realiza la respuesta inmune; como se mencionó anteriormente estas células funcionan como centinelas, ya que al encontrarse en tejidos como la piel, vías respiratorias, vasos sanguíneos e intestinos, son una de las primeras células en enfrentar patógenos o estímulos externos que entran al organismo (Marshall, 2004). Sin embargo, los mastocitos también han sido implicados como efectores cruciales en enfermedades alérgicas y varias otras afecciones inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide, vasculitis y aterosclerosis; en cada uno de estos casos, la degranulación tiene un rol muy importante, pues los mastocitos poseen la capacidad de producir enormes cantidades de citocinas proinflamatorias o proangiogénicas (Marshall, 2004).

Recientemente, el bisfenol A (BPA), ha sido asociado con síntomas de asma grave en humanos (Latini, Knipp, Mantovani, & Marcovecchio, 2010; Spanier, Kahn, Kunselman, & Schaefer, 2014; Vaidya & Kulkarni, 2012), además de numerosos efectos adversos para la salud (Golub *et al.*, 2010).

La exposición de BPA en humanos y animales ha aumentado de manera considerable (Vandenberg, 2007); se ha encontrado presencia de BPA en muestras de orina, suero, sangre y saliva humanas, en cantidades variables, aunque los informes indicaron repetidamente que los niveles de BPA en humanos están en el rango nanomolar (Vandenberg, 2007). Por ejemplo, los niveles típicos de BPA total en adultos resultaron estar en suero y orina en un rango de 1-90nM y 5-10nM, respectivamente (Vandenberg, 2007). Concretamente, la información de los efectos del BPA en la respuesta de mastocitos humanos, es casi nula; la literatura reporta que concentraciones de BPA de 50µM, pueden potenciar la activación de mastocitos (Park & Lim, 2010; Shim & Lim, 2009), sin embargo dichos estudios fueron realizados con diferentes líneas celulares; Park & Lim, utilizaron una línea celular de mastocitos proveniente de sangre periférica del organismo *Rattus norvegicus* (*RBL-2H3*); mientras que Shim & Lim experimentaron con una línea celular de mastocitos humanos (HMC-1), ambos estudios demostraron mediante la determinación de histamina, la activación de las células a concentraciones de BPA de 50µM.

Una respuesta directa o indirecta, puede provocar una activación inapropiada en los mastocitos; cabe mencionar que investigaciones han demostrado que el estradiol, la progesterona, y los xenoestrógenos sintéticos pueden estimular la degranulación de los mastocitos (Jensen *et al.*, 2010; Kennedy *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011) y, dado que los mastocitos juegan un papel central en el asma atópica, se ha formulado la hipótesis de que una exposición generalizada a xenoestrógenos sintéticos influye de manera importante en el desarrollo de dichas enfermedades (Latini *et al.*, 2010; Phillips & Foster, 2008). Estudios realizados con la línea celular BMMC (bone marrow mast cells) han relevado la importancia de la ruta ERK, para que los dichas células liberen histamina después de estimularlos con BPA (O'Brien *et al.*, 2013).

Para determinar la degranulación de los mastocitos estimulados con BPA, se llevó a cabo el ensayo de liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa. La hexosaminidasa pertenece a la familia de las hidrolasas; esta enzima se encuentra presente en los lisosomas de todas las células nucleadas, así como en los gránulos de los mastocitos, cuando existe una liberación de mediadores de mastocitos, se libera la  $\beta$ -hexosaminidasa de sus gránulos, siendo de utilidad como marcador de la degranulación de mastocitos (Rodríguez, 1996).

En la figura 4 y 5, mediante la determinación de liberación de beta-hexosaminidasa y la cuantificación de TNF- $\alpha$  mediante ELISA se observa que no existió activación en los mastocitos estimulados con las diferentes concentraciones de BPA. Se determinó TNF- $\alpha$ , pues los mastocitos al ser activados liberan mediadores preformados almacenados en sus gránulos citoplásmicos, entre los cuales se encuentra la beta-hexosaminidasa y el TNF- $\alpha$  (Boyce, 2003; Bradding *et al.*, 2006). En comparación a estudios previos realizados en mastocitos, en donde se reporta que el BPA potencia la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa inducida por el entrecruzamiento de las IgE (inmunoglobulina E) unidas al Fc $\epsilon$ R1 en la superficie de estas células (Nakajima *et al.*, 2012); de igual manera en la literatura se reporta que los efectos de los estrógenos ambientales, causan la degranulación parcial rápida de los mastocitos (Narita *et al.*, 2007); sin embargo el mastocito humano en comparación con el mastocito murino no libera una gran cantidad de TNF- $\alpha$  (Bischoff, 2007) tal como se denota en la tabla 4, por lo que sería interesante determinar la degranulación del mastocito humano

(LAD2) cuantificando IL-5, después de estimular dichas células con BPA, ya que esta citocina se produce en grandes concentraciones en mastocitos humanos; otro aspecto importante que reporta la literatura es que el mastocito humano se activa clásicamente por el entrecruzamiento de la IgE unida a la superficie celular, por alérgenos en individuos sensibilizados, este mecanismo de la activación de mastocitos a través del FcεRI es un evento crucial en reacciones de hipersensibilidad tipo 1 (Bischoff, 2007). Una vez que los mastocitos se activaron por el entrecruzamiento de la IgE, las células inmediatamente inician la liberación y la síntesis de novo de mediadores, tales como histamina, serotonina, intermedios del ácido araquidónico y citocinas (Gilfillan & Tkaczyk, 2006; Kawakami & Galli, 2002; Metcalfe et al., 1981). Otro aspecto que se debe tomar en cuenta es que la capacidad de los mastocitos para responder a estímulos se ve alterado por el microambiente de citocinas y quimiocinas (Marshall, 2004), en estudios previos se ha demostrado esto, pues se concluyó que el pre-tratamiento en mastocitos con IL-5, junto con la activación mediada por IgE, aumenta la producción de TNF- $\alpha$ , CCL3 and GM-CSF (Ochi et al., 2000); también se ha demostrado que el tratamiento de mastocitos con IL-4 aumenta la expresión de LTC<sub>4</sub> sintetasa (Hsieh et al., 2001). Se ha encontrado que citocinas inflamatorias y mediadores lipídicos induce la producción de citoquinas por los mastocitos; como lo demuestra la observación de que la IL-1 $\beta$  induce la secreción de IL-6 (Kandere-Grzybowska, 2003).

Se propone realizar ensayos de citotoxicidad del BPA en la línea celular LAD2, con la finalidad de detectar la citotoxicidad celular; la cual se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado, mediante mecanismos celulares conocidos. Los efectos adversos producidos por la citotoxicidad celular pueden provocar la interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana, del citoesqueleto, metabolismo, síntesis, degradación y liberación de constituyentes celulares (Repetto, 2002).

**Tabla 4 Principales diferencias funcionales entre los mastocitos murinos y humanos**

<b>Característica</b>	<b>Mastocito de murino</b>	<b>Mastocito de humano</b>
<b>Proteasas</b>	Varias triptasas y quimasas con diferentes especificidades (tales como MCP1-MCP14) y $\beta$ -hexosaminidasa	Tres triptasas ( $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ ); una quimasa
<b>Expresión del receptor de IL-3</b>	+++	+/-
<b>Producción de IL-4</b>	+++	-
<b>Producción de IL-5</b>	+?	+++
<b>Producción de TNF</b>	+++	+
<b>Expresión constitutiva de Fc<math>\gamma</math>RI</b>	+++	+/-
<b>Expresión de CD14</b>	++	-
<b>Expresión constitutiva de TLR</b>	+++	+/-

Siguiendo estos resultados propuestos por Stephan C. Bischoff, se podría mejorar las técnicas para determinar la degranulación de mastocitos, por ejemplo para determinar la degranulación siguiendo el contenido de proteasas se puede realizar una determinación de triptasa, mediante un inmunoanálisis de sándwich, de igual manera se observa en la tabla la  $\beta$ -hexosaminidasa se suele observar de manera considerable en mastocitos de ratón.

Los mastocitos no sólo desempeñan un papel principal en la reacción de hipersensibilidad inmediata al liberar mediadores químicos; también pueden expresar citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y proangiogénicas, estas citocinas están involucradas en fases posteriores del proceso inflamatorio (Drazen *et al.*, 1996).

En los resultados sobre el estudio de la síntesis de *novos* de mediadores como fue triptasa, quimasa, TNF, VEGF, IL-4 e IL-8, después de ser estimuladas con diferentes concentraciones de BPA, se obtuvo una diferencia significativa para VEGF, triptasa, y para IL-8 se obtuvo respuesta significativa con una concentración de BPA de 50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M; teniendo en cuenta

el análisis de la tabla 2, es coherente que no exista síntesis de novo de IL-4 en mastocitos humanos estimulados con BPA.

En la figura 7, 9 se refleja una síntesis de novo significativa para triptasa, IL-8 (concentración de BPA de 50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M), respectivamente, es decir el BPA induce la expresión de dichos genes; la literatura menciona que esto se debe a que múltiples factores de transcripción son inducidos en el citoplasma en células activadas y luego se traslada al núcleo donde ejercen control positivo sobre genes celulares, en particular, la fosforilación de proteincinasas, activadas por mitógenos (MAPK) como JNK, ERK y p38 pueden resultar, directa o indirectamente, en subsecuentes activaciones de factores transcripcionales. En particular, La proteína activadora (AP) -1, la cual es un factor de transcripción sensible a redox que puede regular genes proinflamatorios (Lee *et al.*, 2004).

El complejo AP-1, un heterodímero transcripcionalmente activo de las proteínas Fos y Jun, es uno de los factores de transcripción más analizados en el estudio de la regulación génica en respuesta a señales extracelulares, sin embargo aún se desconoce el mecanismo molecular preciso que fundamente la expresión de dichos genes (Lee *et al.*, 2004).

En la figura 12 se muestra un aumento en la expresión de VEGF, la cual responde a una respuesta concentración dependiente, como se mencionó anteriormente la línea celular LAD2 proviene de un paciente con mastocitosis; la mastocitosis es un término usado para denotar un grupo heterogéneo de condiciones definidas por la expansión y acumulación de mastocitos formando tejido neoplásico en varios órganos, lo que puede ocasionar tumores (Valent *et al.*, 2017). Aunado a esto se ha descrito que en tumores malignos la formación de vasos sanguíneos se promueve mediante la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína encargada del desarrollo de capilares sanguíneos. El BPA tiene un efecto estimulante en la expresión y secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y en su receptor (VEGF-R) a concentraciones nanomolares (1, 40 y 100nM) en células ováricas cancerosas (SKOV-3 y OVCAR-3), pero no en células humanas no cancerosas (HOSEpiC), por lo que el BPA favorece el proceso de crecimiento y adaptación al organismo de los tumores (Ptak & Gregoraszczyk, 2015).

## 12. CONCLUSIONES

No se logró detectar degranulación de manera directa en la línea celular (LAD2) de mastocitos humanos, pues diversos autores refieren que concentraciones similares de BPA potencian la degranulación dependiente de IgE en mastocitos de murinos. En base a esto se propone sensibilizar los mastocitos humanos (LAD2) con IgE para favorecer el entrecruzamiento, y de este modo observar si diferentes concentraciones de BPA estimulan la degranulación de dichas células.

Se concluye que la estimulación de mastocitos humanos con las concentraciones propuestas de BPA, no induce la degranulación, pero si propicia la síntesis de *novo* para los genes de *tripatasa*, *VEGF* e *IL-8*.



### 13. PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentados en el trabajo de tesis experimental, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en:

- Implementar ensayos de citotoxicidad en la línea celular (LAD2) a diferentes concentraciones de BPA.
- Determinar cuáles mediadores de mastocitos y que técnicas experimentales puede evaluar específicamente la degranulación en la línea celular de mastocitos humanos (LAD2).
- Trabajos destinados a completar los aspectos de conocimiento en los efectos del BPA en la línea celular (LAD2), en concreto se podría estudiar la posibilidad de que el BPA tenga la posibilidad de activar a los mastocitos mediante una vía de activación dependiente de IgE.
- Indagar si el microambiente de citocinas y quimiocinas induce o mejora la activación de los mastocitos humanos (LAD2) estimulados con BPA.

## 14. REFERENCIAS

1. Arvan. (1998). Sorting and storage during secretary granule biogenesis: looking backward and looking forward. *The Biochemical Journal*, 15, 593-610.
2. Bischoff. (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature Reviews Immunology*, 7, 93-104.
3. Bischoff, Sellge, Schwengberg, Lorentz, & Manns. (1999). Stem cell factor-dependent survival, proliferation and enhanced releasability of purified mature mast cells isolated from human intestinal tissue. *International Archives Journal of Allergy and Immunology*, 118, 104-107.
4. Boyce. (2003). The role of mast cells in asthma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69, 195-205.
5. Bradding, Walls, & Holgate. (2006). Role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *Journal of allergy and clinical immunology*, 117, 1277-1284.
6. De Coster, & van Larebeke. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *Journal of environmental and public health*, 2012, 1-52.
7. Deb. (2004). Estrogen regulates expression of tumor necrosis factor receptors in breast adipose fibroblasts. *Clinical Endocrinology*, 89, 4018-4024.
8. Díaz. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT- PCR. *Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia*.
9. Dios. (2013). Fundamentos en la reacción de la cadena polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 12, 70-78.
10. DODDS, E. C., & LAWSON, W. (1936). Synthetic estrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*, 137, 996.
11. Dong, Terasaka, & Kiyama. (2011). Bisphenol A induces a rapid activation of ERK1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental pollution*, 159, 212-218.

12. Drazen, Arm, & Austen. (1996). Sorting out the cytokines of asthma. *The Journal experimental medicine*, *1*, 1-5.
13. Durando, Kass, Piva, & Sonnenschein. (2007). Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Endocrinology*, *115*, 80-86.
14. EFSA. (2018). *BPA update: working group to start reviewing new studies*. Recuperado de <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180904>
15. Ehrlich. (1879). Contributions to theory and practice of histological staining. *Pergamon*, 65-68.
16. Farabollini, Porrini, & Dessì-Fulgherit. (1999). Perinatal exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects behavior in male and female rats. *pharmacology, biochemistry and behavior*, *64*, 687-694.
17. Füreder, Agis, Willheim, Maier, & Bankl. (1995). Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *Journal of immunology*, *155*, 3152-3160.
18. Gao, Chen, Fan, & Zhou. (2016). Occurrence and Maternal Transfer of Chlorinated Bisphenol A and Nonylphenol in Pregnant Women and Their Matching Embryos. *Environmental science y technology*, *50*, 970-977.
19. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, & Scippo ML & Covaci A,. (2012). A review of dietary and nondietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology*, *50*, 3725-374.
20. Gilfillan, & Tkaczyk,. (2006). Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature reviews immunology*, *6*, 218-230.
21. Golub, Wu, Li, & Kaufman. (2010). Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. *Reproductive toxicology*, *89*, 441-466.
22. Guhl, Artuc, & Zuberbier. (2012). Testosterone exerts selective anti-inflammatory effects on human skin mast cells in a cell subset dependent manner. *Experimental Dermatology*, *21*, 878-880.
23. Heindel. (2003). Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicological sciences*, *76*, 247-249.

24. Hong, Shimomura-Shimizu, Muroi, & Tanamoto. (2004). Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biological y pharmaceutical bulletin*, 27, 1136-1139.
25. Hsieh, Lam, Penrose, Austen, & Boyce. (2001). T helper cell type 2 cytokines coordinately regulate immunoglobulin E-dependent cysteinyl leukotriene production by human cord blood-derived mast cells: profound induction of leukotriene C4 synthase expression by interleukin 4. *Journal of Experimental Medicine*, 193, 123-133.
26. Jensen, Woudwyk, Teles, Teran, & Woidacki. (2010). Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. *PLoS one*, 5, 14409.
27. Juan-García, & Gallego C. (2015). Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Revista de Toxicología*, 32, 144-160.
28. Kandere-Grzybowska,. (2003). IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *Journal Immunology*, 171, 4830-4836.
29. Kavlock, Daston, De Rosa, & Fenner-Crisp. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Enviromental Health Perspectives*, 1996, 715-740.
30. Kawakami, & Galli. (2002). Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nature reviews immunology*, 2, 773-786.
31. Kennedy, Tupper, & Pelletier. (2012). Estrogen mimetic 4-tert-octylphenol enhances IgE-mediated degranulation of RBL-2H3 mast cells. *Journal of Toxicology and enviromental health. Part a*, 75, 1451-1455.
32. Kirshenbaum, A. S., Cem Akin a, Yalin Wu, & Menachem Rottem. (2003). Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcεRI or FcRI. *Leukemia Research*, 7, 677-682.
33. Koolman, & RÖhm. (2012). *Bioquímica Humana* (4a ed.). Madrid: Panamericana.

34. Kundakovic, & Champagne. (2011). Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain, Behavior and Immunity*, 25, 1084-1093.
35. Kuruto-Niwa (último), Tateoka, Usuki, & Nozawa. (2007). Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere*, 6, 1160-1164.
36. Kwintkiewicz. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor-g mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environmental Health Perspectives*, 56, 400-406.
37. Latini, Knipp, Mantovani, & Marcovecchio. (2010). Endocrine disruptors and human health. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10, 846-855.
38. Lee, & Lim. (2012). CTB glycoprotein (75 kDa) inhibits IgE releasing, TNF- $\alpha$  and IL-6 expressed by bisphenol A in vivo and in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2109-2117.
39. Lee, Oh, & Lim. (2011). Allergy-related cytokines (IL-4 and TNF- $\alpha$ ) are induced by Di(2-ethylhexyl) phthalate and attenuated by plant-originated glycoprotein (75 kDa) in HMC-1 cells. *Environmental Toxicology*, 26, 364-372.
40. Lee, Tuckerman, Nechushtan, & Schutz. (2004). c-Fos as a Regulator of Degranulation and Cytokine. *Journal Immunology*, 15, 2571-2577.
41. Marshall. (2004). Mast cell responses to pathogens. *Nature reviews immunology*, 4, 786-799.
42. Matsushima, Kakuta, Teramoto, & Koshiba. (2007). Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR-g. *Journal of Biochemistry*, 142, 517-524.
43. Metcalfe, Kaliner, & Donlon. (1981). The mast cell. *Critical Reviews in Immunology*, 3, 23-34.
44. Mileva, Baker, Konkle, & Bielajew. (2014). Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *International journal of environmental research and public health*, 11, 7537-7561.
45. Moon, Lauren, & Morris. (2010). Advances in mast cell biology: New understanding of heterogeneity and function. *Mucosal immunology*, 3, 111-128.

46. Muñoz-Cruz, Mendoza-Rodríguez, & Yopez-Mulia. (2015). Gender-related effects of sex steroids on histamine release and FcεRI expression in rat peritoneal mast cells. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1-10.
47. Nakajima, Goldblum, & Midoro-Horiuti. (2012). Fetal exposure to bisphenol A as a risk factor for the development of childhood asthma: an animal model study. *Environmental Health Perspectives*, 21, 11-18.
48. Narita, Goldblum, Watson, & Brooks. (2007). Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators. *Environmental Health Perspectives*, 115, 48-52.
49. Nilsson, Johnell, Hammer, Tiffany, & Metcalfe. (1996). C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *Journal Immunology*, 15, 1693-1698.
50. O'Brien, Dolinoy, & Mancuso. (2013a). Bisphenol A at concentrations relevant to human exposure enhances histamine and cysteinyl leukotriene release from bone marrow-derived mast cells. *Journal of immunotoxicology*, 10, 1-6.
51. O'Brien, Dolinoy, & Mancuso. (2013b). Perinatal bisphenol A exposures increase production of pro-inflammatory mediators in bone marrow-derived mast cells of adult mice. *Journal of immunotoxicology*, 2013, 4-6.
52. Ochi, Hsieh, Austen, De Jesús, & Boyce. (2000). IL-4 and -5 prime human mast cells for different profiles of IgE-dependent cytokine production. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97, 10509–10513.
53. OMS. (2009, noviembre 27). BISFENOL A (BPA) – Estado actual de los conocimientos y medidas futuras de la OMS y la FAO. Recuperado de [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_05\\_Bisphenol\\_A\\_Nov09\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_sp.pdf)
54. Park, & Lim. (2010). Phytoglycoprotein (75 kDa) Suppresses Release of Histamine and Expression of IL-4 and IFN- $\gamma$  in BPA-treated RBL-2H3 Cells. *Immunological Investigations*, 39, 171-185.
55. Phillips, & Foster. (2008). Endocrine toxicants with emphasis on human health risks. *Journal of Toxicology and environmental health. Part b*, 11, 149-151.

56. Ptak, & Gregoraszcuk. (2015). Effects of bisphenol A and 17 $\beta$ -estradiol on vascular endothelial growth factor A and its receptor expression in the non-cancer and cancer ovarian cell lines. *Cell biology and toxicology*, 31, 187-797.
57. Repetto, M. (2002). *Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group.
58. Rigoni. (2015). The role of mast cell in molding the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, 8, 167-176.
59. Rodríguez. (1996). Determinación de la actividad de enzimática de la hexosaminidasa en fluidos corporales. *Revista Biomédica*, 321-325.
60. Rojas W. (2015). *inmunología de Rojas (17 a)*. México: CIB.
61. Romano. (2012). Disruptores endocrinos: Nuevas respuestas para nuevos retos. *Instituto Sindical del Trabajo, Ambiente y Salud*, 2-60.
62. Routledge, White, Parker, & Sumpter. (2000). Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ER beta. *The journal of biological chemistry*, 275, 35986-35993.
63. Seachrist, Bonk, Ho, Prins, & Soto. (2016). A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reproductive toxicology*, 59, 167-182.
64. Segura, Jiménez-Rubio, Pulgar, & Olea. (1999). In vitro effect of the resin component bisphenol A on substrate adherence capacity of macrophages. *Journal Endodontics*, 25, 341-344.
65. Shim JU, & Lim. (2009). Inhibitory effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* bureau on expression of inflammation-related cytokine in bisphenol A-treated HMC-1 cells. *Inflammation*, 32, 211-217.
66. Soman, & Ashley. (2010a). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature reviews immunology*, 10, 440-452.
67. Soman, & Ashley. (2010b). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature reviews immunology*, 10, 440-452.

68. Spanier, Kahn, Kunselman, & Schaefer. (2014). Bisphenol a exposure and the development of wheeze and lung function in children through age 5 years. *JAMA pediatrics*, *168*, 1131-1137.
69. Sui, Park, Rios-Pilier, & Perkins. (2012). Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor. *Enviromental Health Perspectives*, *120*, 399-405.
70. Sundstrom, Vliagoftis, Karlberg, Butterfield, Nilsson, & Metcalfe. (2003). Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene. *Immunology*, *108*, 89-97.
71. Takao. (1999). Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Reviews on environmental contamination and toxicology*, *228*, 215-254.
72. Thermo Fisher Scientific. (2015). RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1621>
73. Toru, Pawankar, Ra, & Yata. (1998). Human mast cells produce IL-13 by high-affinity IgE receptor cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4-primed human mast cells. *The journal allergy and clinical immunology*, *102*, 491-502.
74. Vaidya, & Kulkarni. (2012). Association of urinary bisphenol A concentration with allergic asthma: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. *The journal of asthma*, *49*, 800-8006.
75. Valent, Akin, Nilsson, & Hartmann. (2017). Advances in the classification and treatment of mastocytosis: current status and outlook toward the future. *Cancer Resolution*, *77*, 1261–1270.
76. Vandenberg, & Hauser. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology*, *24*, 139-177.
77. Vliagoftis, Dimitriadou, & Theoharides. (1990). Progesterone triggers selective mast cell secretion of 5-hydroxytryptamine. *International archives journal of allergy and applied immunology*, *93*, 113-119.
78. Völkel. (2005). Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition*, *33*, 1748-1757.



79. Wernersson, & Pejler. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Immunology*, *14*, 478-494.
80. Yu, Huang, Mao, Zhang, Jin, & Chen. (2016). Go is required for the release of IL-8 and TNF- $\alpha$ , but not degranulation in human mast cells. *European Journal of pharmacology*, *5*, 115-121.
81. Zoeller, Bansal, & Parris. (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*, *146*, 607-612.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Determinación de TNF-alfa humano mediante el kit de ELISA sándwich PEPROTECH®

- Preparación de la Placa
  - Diluir el anticuerpo de captura con PBS a una concentración de 1µg/mL, Inmediatamente añadir 100µL a cada placa de ELISA; sellar la placa e incubar durante la noche a temperatura ambiente.
  - Aspirar los pozos para extraer el líquido, lavar la placa cuatro veces con 250µL de tampón de lavado, invertir la placa para quitar los restos del buffer y colocar en toalla de papel.
  - Añadir 300µL de tampón de bloqueo a cada pocillo, incubar durante una hora a temperatura ambiente.
  - Se aspira y se lava la placa cuatro veces.
- Protocolo para ELISA
  - Estándar/Muestra: Diluir el estándar de 2ng/mL a cero en el diluyente, inmediatamente añadir a los pozos 100µL de la curva del estándar ó de la muestra por duplicado, incubar a temperatura ambiente por dos horas.
  - Detección: Aspirar la placa y lavar cuatro veces. Diluir el anticuerpo de detección en el diluyente a una concentración de 0.25µg/mL. Agregar 100µL por pocillo, incubar 30min a temperatura ambiente.
  - ABTS: Aspirar y lavar la placa cuatro veces, añadir 100µL de ABTS por cada pocillo, incubar a temperatura ambiente, para el desarrollo de color.
  - Leer la placa a 405nm, corrigiendo a 650nm

### ANEXO 2: Extracción de RNA usando RNeasy Minikit de QIAGEN®

- Después de la incubación de las células LAD2 tratadas, se traspasó el contenido de cada pozo a microtubos y se centrifugó a 8000rpm por 5min.
- Las pastillas de células se lisaron y homogeneizaron en 350µL de buffer RLT (el buffer contiene tiocianato de guanidina. EL buffer RLT tiene que mezclarse con β-mercaptoetanol antes de usarse; se adiciona 10µL de β-mercaptoetanol por cada mililitro de buffer RLT
- Poner el lisado de células directamente en la columna QIAshedder, la cual se encuentra colocada en un tubo colector de 2mL, centrifugar durante 2min a 14 000rpm
- Desechar la columna y adicionar 350µL de etanol al 70% al lisado que se encuentra en el tubo colector de 2mL, mezclar por pipeteo
- Transferir toda la muestra a la columna RNeasy, la cual se encuentra en un tubo colector de 2mL, centrifugar por 15seg a 10 000rpm; desechar el filtrado y re-usar el tubo colector para el siguiente paso.
- Adicional 700µL del buffer RW1 a la columna RNaeasy con la finalidad de enjuagar la columna, centrifugar durante 15seg a 10 000rpm; desechar el filtrado y el tubo colector

- Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 2mL. Adicionar 500µL de buffer RPE a la columna, centrifugar por 15seg a 10 000rpm; desechar el filtrado y re-usar el tubo colector para el siguiente paso
- Adicionar a la columna 500µL de buffer RPE a la columna, centrifugar por 2min a 14 000rpm, con la finalidad de secar la columna y eliminar cualquier residuo de etanol
- Transferir la columna a un tubo colector nuevo de 1.5mL y adicionar a la columna 30µL de agua libre de RNAsas
- Se cuantifica el RNA de cada muestra mediante NanoDrop®
- Guardar las muestras correspondientes en alícuotas donde contenga 1µg de RNA, a -70°C, para posteriormente obtener la síntesis de cDNA

### **ANEXO 3: Síntesis de cDNA usando el kit RevertAid first strand de Thermo Scientific®**

- Descongelar a temperatura ambiente las muestras y los componentes del kit, después mantener en hielo.
- Agregar los siguientes reactivos en un tubo estéril, libre de nucleasas, en el siguiente orden
  1. RNA (muestra): RNA total 1µg
  2. Agua libre de nucleasas: 10µL
- Añadir los siguientes componentes en el orden indicado
  1. Buffer de reacción 5X: 4µL
  2. Inhibidor de RNAsas RiboLock (20U/µL): 1µL
  3. Mix dNTP 10mM: 2µL
  4. Primer: Oligo (dT) primer: 1µL
  5. Random hexamer: 1µL
  6. RevertAid M-MuLV RT (200U/µL): 1µL
  7. Volumen final con la muestra: 20µL
- Mezcla suavemente y centrifuga brevemente
- Colocar las muestras en el termociclador y programar en el orden como se muestra a continuación
  1. Incubar a 42°C por 60min
  2. Incubar por 5min a 25°C
  3. Incubar nuevamente 42°C por 60min
  4. Terminar la reacción calentando a 70°C por 5 min
- El producto se almacena a -20°C, para su posterior uso en el q-PCR

### **Anexo 4: q-RTPCR Light Cyclor 480 SYBR Green Master 2X**

- Preparar una dilución de cDNA a 1:3 con agua libre de endonucleasas
- Preparar los iniciadores de PCR a una concentración 10µM
- Preparación de Master Mix (volumen final de reacción: 10µL). Se prepara por separado por cada juego de primers. Analizar cada muestra por triplicado; agregar en el siguiente orden
  1. Agua grado PCR: 1.5µL
  2. Primer F: 0.5µL (concentración final de 0.5µM)

3. Primer R: 0.5 $\mu$ L (concentración final de 0.5 $\mu$ M)
  4. 2X SYBR Green: 5 $\mu$ L
- Mezclar suavemente con la micropipeta
  - Distribuir 7.5 $\mu$ L del master mix en cada pozo (LightCycler 480 multiwell plate)
  - Adicionar 2.5 $\mu$ L del cDNA correspondiente a cada muestra; al control negativo el cual no contiene cDNA, solo se le adiciona agua
  - Centrifugar la placa a 3000rpm por 2min
  - Sellar la placa
  - Colocar la placa en el equipo LightCycler 480 y programar como se muestra a continuación.
    1. Preincubación: 95°C por 5min
    2. Amplificación
      - a. Desnaturalización: 95°C por 15seg
      - b. Alineación: 60°C por 30seg
      - c. Extensión: 72°C por 30seg
    3. Curva de disociación
      - a. 95°C por 5 min
      - b. 65°C por 1min
    4. Enfriamiento: 40°C por 30seg