

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Participación de la cinasa Lyn en los efectos del LPS sobre las
respuestas inducidas por el receptor Fc épsilon RI en células
cebadas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ALEJANDRO MARTÍN ÁVILA HERNÁNDEZ



TUTORA
DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de datos del jurado

<p>1. Datos del alumno Ávila Hernández Alejandro Martín 54 21 61 49 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 099016555</p>
<p>2. Datos del tutor Dra Claudia González Espinosa</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra Marina Macías Silva</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr Jesús Adolfo García Sáinz</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr Víctor Manuel Valdés López</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M en C Jaciél Medina Tamayo</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Participación de la cinasa Lyn en los efectos del LPS sobre las respuestas inducidas por el receptor Fc épsilon RI en células cebadas 95 p 2007</p>

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVÁNAMA DE
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

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

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
"Participación de la cinasa Lyn en los efectos del LPS sobre las
respuestas inducidas por el receptor Fc épsilon RI en células cebadas"

realizado por Ávila Hernández Alejandro Martín

con número de cuenta 09901655-5 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario Dra. Claudia González Espinosa

Propietario Dra. Marina Macías Silva

Propietario Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Suplente Dr. Víctor Manuel Valdés López

Suplente M en C. Jaciel Medina Tamayo

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 9 de enero
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA

del 2007



Dr. Zenón Cano Santana

Todas las actividades reportadas en esta tesis de licenciatura fueron realizadas en el laboratorio 11 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Sede Sur, durante el periodo de enero de 2005 a diciembre de 2006 bajo la dirección de la Dra. Claudia González Espinosa. Durante el tiempo en el que se realizó esta tesis, se terminaron de cubrir todos los créditos de las materias correspondientes a los últimos 3 semestres de la carrera de Biología impartida en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 El sistema inmune.....	11
1.2 La inmunoglobulina E.....	13
1.3 Los alergenosen.....	14
1.4 Las células cebadas.....	15
1.5 Las fases temprana y tardía de las respuestas alérgicas.....	17
1.6 Estructura y señalización del FcεRI.....	19
1.7 La vía dependiente de Lyn.....	20
1.8 La vía dependiente de Fyn	23
1.9 Cinasas de la familia Src en células cebadas.....	25
1.10 Consecuencias de la ausencia de Lyn.....	25
1.11 Regulación negativa de Lyn sobre Fyn.....	26
1.12 Receptores tipo Toll.....	27
1.13 Un ligando para el TLR4: el LPS.....	30
1.14 Señalización del TLR-4.....	31
1.15 La vía dependiente de MyD88.....	33
1.16 La vía independiente de MyD88.....	35
1.17 Comunicación cruzada.....	35
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo general.....	38
2.2 Objetivos particulares.....	38
3. HIPÓTESIS.....	38

4. MATERIALES Y MÉTODO	39
4.1 Ratones	39
4.1.1 Generación de ratones Lyn-/-.....	39
4.2 Genotipificación	40
4.2.1 Purificación de DNA.....	40
4.2.2 Amplificación de DNA.....	41
4.3 Cultivos	42
4.3.1 Extracción de células cebadas derivadas de médula ósea.....	42
4.4 Tratamientos	43
4.4.1 Tratamiento de células cebadas derivadas de médula ósea.....	43
4.5 Ensayos de desgranulación	43
4.5.1 Determinación de β -hexosaminidasa en células cebadas.....	43
4.6 Transcripción Inversa (RT)	46
4.6.1 Purificación de RNA.....	46
4.6.2 Síntesis de cDNA.....	47
4.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	47
4.7.1 Amplificación de cDNA.....	47
4.8 Electroforesis de ácidos nucleicos	48
4.9 Ensayos de ELISA	49
4.9.1 Estimulación prolongada de células cebadas.....	49
4.9.2 Detección de IL-2 e IL-4.....	50
4.10 Pruebas estadísticas	52

5. RESULTADOS.....	53
5.1 Efecto de la IgE en la desgranulación antigénica de células cebadas Lyn^{+/+}.....	53
5.2 Efecto de la IgE en la desgranulación antigénica de células cebadas Lyn^{-/-}.....	54
5.3 Efecto de la preincubación con LPS sobre células cebadas sensibilizadas con una concentración suficiente de IgE.....	56
5.4 Efecto de la preincubación con LPS sobre células cebadas sensibilizadas con una concentración saturante de IgE.....	57
5.5 Inducción del RNAm de IL-2 en células cebadas Lyn^{+/+} activadas antigénicamente.....	59
5.6 Efecto de la preincubación con LPS sobre la síntesis de RNAm de IL-2 en células cebadas Lyn^{+/+} activadas antigénicamente.....	60
5.7 Inducción del RNAm de IL-2 en células cebadas Lyn^{-/-} activadas antigénicamente	60
5.8 Efecto de la preincubación con LPS sobre la síntesis de RNAm de IL-2 en células cebadas Lyn^{-/-} activadas antigénicamente.....	61
5.9 Inducción del RNAm de IL-4 en células cebadas Lyn^{+/+} sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.....	63
5.10 Inducción del RNAm de IL-4 en células cebadas Lyn^{-/-} sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.....	63
5.11 Secreción de IL-2 en células cebadas Lyn^{+/+} sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.....	64
5.12 Secreción de IL-2 en células cebadas Lyn^{-/-} sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.....	65

5.13 Secreción de IL-4 en células cebadas Lyn ^{+/+} sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.....	66
5.14 Secreción de IL-4 en células cebadas Lyn ^{-/-} sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.....	67
6. DISCUSIÓN.....	69
7. CONCLUSIÓN.....	82
8. REFERENCIAS.....	83
Apéndice 1.....	90
Apéndice 2.....	91
Abreviaturas.....	92

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

1. La célula cebada.....	16
2. Cascada de señalización principal en las células cebadas activas.....	22
3. Cascada de señalización complementaria en las células cebadas activadas.....	24
4. Estructura de los receptores tipo Toll.....	28
5. Respuestas inmunes medidas por los TLRs.....	30
6. Estructura esquemática del LPS.....	31
7. Reconocimiento del LPS.....	32
8. Señalización del TLR4.....	33
9. El TLR4 activa las vías dependientes de MyD88 y TRIF.....	34
10. Mapas de restricción de gen activo de Lyn y del pseudogen de Lyn.....	40
11. Gel representativo de la genotipificación.....	42
12. Desgranulación de células Lyn ^{+/+} (200 y 600 ng/ml de IgE).....	54
13. Desgranulación de células Lyn ^{-/-} (200 y 600 ng/ml de IgE).....	55
14. Desgranulación de células Lyn ^{+/+} (200 ng/ml de IgE) preincubadas con o sin LPS.....	56
15. Desgranulación de células Lyn ^{-/-} (200 ng/ml de IgE) preincubadas con o sin LPS.....	57
16. Desgranulación de células Lyn ^{+/+} (600 ng/ml de IgE) preincubadas con o sin LPS.....	58
17. Desgranulación de células Lyn ^{-/-} (600 ng/ml de IgE) preincubadas con o sin LPS.....	59
18. Inducción de RNAm de IL-2 e IL-4.....	62
19. Secreción de IL-2.....	66
20. Secreción de IL-4.....	68
21. Región promotora de IL-2.....	74
22. Región promotora de IL-4.....	76

TABLAS

1. Algunos receptores que influyen la activación de las células cebadas.....	17
2. Productos secretados en las células cebadas.....	20
3. Receptores tipo Toll: sus ligandos y orígenes.....	29
4. Tratamientos con los que se preincubaron a las células Lyn ^{+/+} y Lyn ^{-/-}	43
5. Ensayos y tratamientos.....	45
6. Números de células para los tratamientos de ELISA.....	49
7. Ensayos para la detección de citocinas por ELISA.....	50

RESUMEN

Las células cebadas son un tipo celular que forma parte del sistema inmune ya que pueden participar en la respuesta del hospedero frente a estímulos de la inmunidad innata. Estas células también han sido estudiadas por ser las principales efectoras de las reacciones de hipersensibilidad tipo I, mejor conocidas como reacciones alérgicas. Dichas reacciones requieren de la presencia de la inmunoglobulina E (IgE) unida a su receptor (FcεRI), y del encuentro antigénico. El inicio de la activación es inducido cuando dos receptores se entrecruzan gracias al antígeno, lo que desencadena una serie de eventos intracelulares que culminan con la liberación de los gránulos citoplasmáticos y con la síntesis *de novo* y secreción de citocinas. Las respuestas de inmunidad innata por parte de las células cebadas comienzan cuando un ligando conocido como endotoxina o lipopolisacárido (LPS) se une a su receptor (TLR-4: Toll Like Receptor 4), provocando que se active una vía intracelular que termina con la expresión de genes de citocinas. Las vías del FcεRI y del TLR-4 están presumiblemente relacionadas aunque no en todos los parámetros de activación en las células cebadas, sin embargo, las proteínas y/o complejos que acoplan a estas dos vías son aun desconocidos(as). En el presente trabajo se obtuvieron células cebadas derivadas de médula ósea (BMMCs: Bone Marrow derived Mast Cells) de ratones tipo silvestre y carentes de la cinasa Lyn, y se les trató con IgE, LPS e IgE+LPS. A través de ensayos de desgranulación se encontró que las cantidades de IgE pueden influenciar el umbral de respuesta de las células cebadas, y que la presencia de LPS no modifica la capacidad de las células para llevar a cabo la liberación del contenido granular. No obstante, cuando se midieron los transcritos de interleucina 2 (IL-2) e IL-4 por RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), se vio que la cinasa Lyn regula negativamente la vía del TLR-4 inducida por LPS que lleva a la síntesis del transcrito de IL-2, y que el LPS puede activar una vía independiente de Lyn en la síntesis de esta citocina en células estimuladas antigénicamente. Por otra parte, el tratamiento con LPS y la cinasa Lyn no afectaron la síntesis del mensajero de IL-4. Cuando se midió la cantidad de proteína por ensayos de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), se observó que la cinasa Lyn puede ser un regulador positivo o negativo de la secreción de IL-2 e IL-4 respectivamente, y que el LPS puede desensibilizar la secreción de estas citocinas en células cebadas estimuladas antigénicamente.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 El sistema inmune

El sistema inmune es el conjunto de células y moléculas responsables de llevar a cabo la defensa del organismo frente al huésped. Este sistema es capaz de reconocer una variedad muy amplia de partículas, entre las que se encuentran diversos patógenos intracelulares (virus y algunas bacterias) y extracelulares así como macromoléculas tales como los alérgenos (proteínas y polisacáridos). La respuesta colectiva y coordinada a la introducción de sustancias extrañas al organismo es conocida como respuesta inmune (1).

En los mamíferos, existen dos tipos de respuestas inmunes. La primera se conoce como inmunidad innata o natural, que funciona a través de mecanismos bioquímicos y celulares encaminados a una respuesta rápida montada en contra de agentes infecciosos. Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas tales como el epitelio y las sustancias antimicrobianas producidas en la superficie epitelial, células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos), células asesinas naturales (NK), proteínas de la sangre (componentes del complemento y otros mediadores de la inflamación) y citocinas (proteínas secretadas por células del sistema inmune). Las células que conforman la respuesta inmune innata presentan una variedad de receptores de reconocimiento de patrones en sus membranas celulares. Dichos patrones pueden estar asociados a diversos patógenos, los cuales se encuentran altamente relacionados entre sí en términos evolutivos (1).

El segundo tipo de respuesta inmune es la inmunidad adaptativa, también llamada específica o adquirida. Tal inmunidad muestra una gran especificidad por antígenos microbianos y no microbianos. A diferencia de la inmunidad innata, cuya diversidad para reconocer agentes extraños es limitada y se encuentra codificada en la línea germinal, la inmunidad adaptativa presenta una amplia diversidad gracias a los receptores producidos durante la recombinación somática de segmentos genéticos en respuesta a una sustancia. Además, este sistema tiene “memoria”, una característica que le permite “recordar” agentes con los que previamente ha tenido contacto y montar así una respuesta más efectiva en su contra. Por esta razón la respuesta ejercida por la inmunidad adaptativa es desarrollada a largo plazo. Las barreras físicas y químicas de este tipo de inmunidad involucran la presencia de linfocitos en el epitelio, anticuerpos (inmunoglobulinas) secretados al torrente sanguíneo y a las superficies epiteliales, además de la producción de citocinas. Las células que participan en la inmunidad adaptativa son los linfocitos B y T. Los linfocitos B pueden desencadenar un tipo de respuesta inmune adaptativa denominada inmunidad humoral la cual comprende la producción de anticuerpos. Por su parte, los linfocitos T pueden ejercer un tipo de respuesta el cual es conocido como inmunidad celular (1).

En términos generales, aunque hay dos tipos de respuesta en el contexto inmunológico, existen células que son capaces de integrar estímulos de la inmunidad adaptativa y de la inmunidad innata. Tal es el caso de las células cebadas cuya función está relacionada con la isoforma E de las inmunoglobulinas (Igs) producida por las células B, y con el reconocimiento de agentes involucrados en la activación de la respuesta inmune innata.

1.2 La inmunoglobulina E (IgE)

La inmunoglobulina E (IgE) es un anticuerpo producido por las células B. Esta inmunoglobulina está formada por dos cadenas pesadas ϵ , de ahí el nombre de IgE. Este anticuerpo, al igual que los demás isotipos, tiene una región Fab con la que reconoce antígenos (alergenos en el caso de la IgE) y una región Fc con la que se une a los receptores $Fc\epsilon RI$ y $Fc\epsilon RII$. Las cadenas pesadas se unen por medio de puentes disulfuro a dos cadenas ligeras, adquiriendo un peso total de alrededor de 188 kiloDaltones (kDa) (2).

Los receptores $Fc\epsilon RI$ y $Fc\epsilon RII$ se hallan distribuidos diferencialmente en diversas células del sistema inmune. Por ejemplo, el receptor $Fc\epsilon RI$, además de estar en basófilos y células cebadas y estar involucradas en las reacciones alérgicas, está en células presentadoras de antígenos (APCs) tales como monocitos, células de Langerhans y células dendríticas. Sin embargo, se desconoce la función del receptor en estas células. Por otra parte el receptor $Fc\epsilon RII$ también conocido como CD23 tiene dos formas, CD23a y CD23b. CD23a está presente en las células B y CD23b es inducido por la Interleucina 4 (IL-4) en células T, células de Langerhans, monocitos, macrófagos y eosinófilos. Ambas formas llevan a cabo la endocitosis de partículas cubiertas por IgE, pero el papel fisiológico de este receptor es desconocido (1).

Las reacciones de hipersensibilidad tipo I (también conocidas como alergias) tienen su origen con la entrada del alérgeno al organismo. De esta manera, el alérgeno puede ser reconocido por las células B. La consecuencia de este encuentro es el cambio de la célula B hacia un fenotipo productor y secretor de inmunoglobulina E (IgE). A este evento se le conoce como primera exposición al antígeno.

La IgE entonces es liberada a la circulación y cuando ésta ha llegado hasta los tejidos periféricos tales como el epitelio, la mucosa o las terminales nerviosas, se une a las células cebadas provocando un fenómeno llamado sensibilización. Por esta razón, éstas células son las principales efectoras de las reacciones alérgicas mediadas por IgE. Una segunda exposición al antígeno llevada a cabo por las células cebadas desencadenará una reacción de hipersensibilidad tipo I. Otra forma en la que las células del sistema inmune pueden reconocer al antígeno es cuando las células presentadoras de antígenos (APCs) reconocen y fagocitan al alérgeno para romperlo en pequeños péptidos y presentarlo mediante el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), al receptor de la célula T (TCR) (3). Enseguida de que se ha dado la interacción entre la célula presentadora de antígenos y la célula T, ésta última se disocia para encontrarse con una célula B. Cuando se lleva a cabo este encuentro se requiere la presencia de IL-4 e IL-13 para que el cambio de isotipo por parte de la célula B tenga lugar. De esta manera comienza la producción de IgE que viaja a través del torrente sanguíneo para encontrarse con las células cebadas en los tejidos periféricos (3).

1.3 Los alérgenos

Los antígenos denominados alérgenos son moléculas que se caracterizan por no ser agentes infecciosos pero que desencadenan reacciones alérgicas. En el ambiente existe una enorme variedad de alérgenos entre los que se encuentran porciones del

exoesqueleto de los artrópodos (quitina), agentes químicos parecidos a la penicilina, polen de plantas y hongos, sustancias inoculadas al organismos por las picaduras de abejas y otros insectos, partículas de polvo común, algunos componentes que se hallan en los alimentos (partículas de bajo peso molecular altamente glucosiladas), caspa y pelo de algunos mamíferos, entre otros (4).

Si bien los alérgenos no inducen respuestas de inmunidad innata, si tienen la capacidad de desencadenar las reacciones alérgicas, lo que incluye la producción de IgE, la preactivación de las células cebadas y las subsecuentes reacciones de hipersensibilidad desarrolladas (5).

1.4 Las células cebadas

Las células cebadas son un tipo celular de linaje mieloide que se deriva de la médula ósea por medio de un proceso denominado hematopoiesis. Las células viajan como precursores inmaduros hacia diferentes tejidos vascularizados donde completan su maduración. Tales tejidos comprenden a los epitelios, los vasos sanguíneos, los tractos gastrointestinal y respiratorio, los nervios, la piel, peritoneo y en las glándulas productoras de moco. Las células cebadas llegan a la maduración una vez que han estado en contacto con el factor de célula madre (SCF, ligando de c-kit) y con la interleucina 3 (IL-3), la cual además induce su proliferación. Las células cebadas maduras expresan a un molecula membranal llamada CD34, la cual le confiere una identidad particular a este tipo celular (3 y 5).

Éstas células se caracterizan por expresar en su superficie al receptor que reconoce a la porción Fc de la inmunoglobulina E, y por presentar numerosos gránulos citoplasmáticos electrodensos llenos de mediadores de la inflamación que son liberados en respuesta a la estimulación del receptor FcεRI (6) (figura 1).

Las células cebadas constituyen un tipo celular muy heterogéneo por lo que pueden existir diferentes poblaciones que muestran características particulares dependiendo del sitio anatómico donde éstas residan; debido a esto, se ha dicho que las células cebadas son un tipo celular con mucha plasticidad (5). Un ejemplo son las células cebadas de las mucosas cuyo contenido granular posee mayoritariamente sulfato de condroitina y bajos niveles de histamina y se diferencian *in vitro* en presencia de IL-3. En contraste, las células cebadas del tejido conectivo (presentes en pulmón y cavidades serosas del cuerpo) presentan grandes cantidades de un proteoglicano llamado heparina al igual que niveles elevados de histamina y su diferenciación *in vitro* requiere de SCF (1).

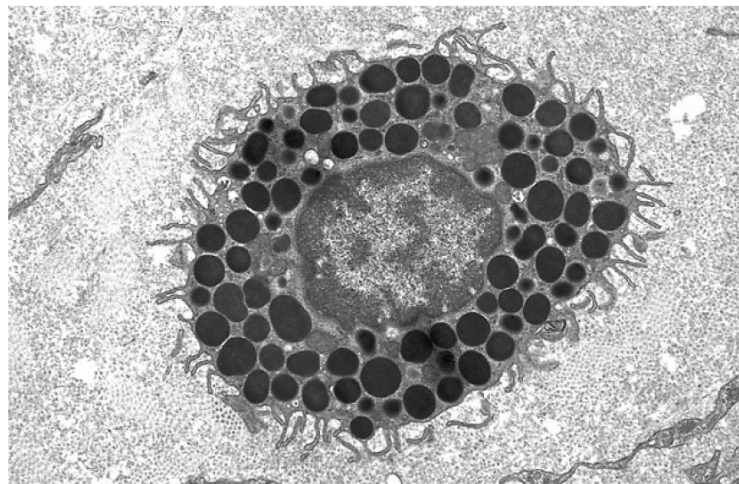


Figura 1. **Célula cebada.** Micrografía electrónica de un corte de célula cebada. En ella se pueden observar los gránulos electronodensos donde son almacenadas diversas sustancias mediadoras de la inflamación. En el perímetro se pueden distinguir proyecciones citoplásmicas. Al centro se observa un núcleo grande con la cromatina compactada. Fotografía tomada de la página www.coeh.man.ac.uk/cgi-bin/.../launch.pl?link_id=55.

Aunque la presencia del receptor $Fc\epsilon RI$ es una característica de las células cebadas que le confiere una función en las reacciones alérgicas, una gran variedad de receptores se hallan en la membrana (Tabla 1), por lo que estas células tienen la capacidad de censar distintos componentes del medio en el que se encuentran. Un ejemplo de esto es la presencia de receptores tipo Toll (TLRs), receptores para citocinas, quimiocinas y receptores para componentes del complemento, entre otros (7) (Tabla 1).

Tabla 1 Algunos receptores y ligandos que influyen la activación de las células cebadas.

Receptor	Especies que lo presentan (reportadas hasta 2006)	Ligando
FcεRI, FcγRI, FcγRIII	Ratón, rata y humano	Antígeno unido a IgE e IgG
C3aR	Humano	C3a
A3R	Ratón	Adenosina
CCR1	Ratón	CCL3
CCR3	Humano	CCL11
S1P2	Ratón	S1P
IL-3R	Humano	IL-3
IL-4R	Ratón, humano	IL-4
IL-5R	Humano	IL-5
IL-10R	Ratón, rata, humano	IL-10
TGFβR1	Ratón, rata	TGFβ
KIT	Ratón, rata, humano	SCF
TLRs	Ratón, rata, humano	PAMPs

A3R: receptor para adenosina; C3a: componente 3a del complemento; C3aR: receptor para C3a; CCL: ligando quimiocina CC; CCR: receptor para quimiocina CC; FcγRI: receptor de alta afinidad para la IgG; FcεRI: receptor de alta afinidad para la IgE; FcγRIII: receptor de baja afinidad para la IgG; Gαi: Subunidad α de proteína G inhibidora; IL: Interleucina; IL-3R: receptor para IL-3; IL-4R: receptor para IL-4; IL-5R: receptor para IL-5; IL-10R: receptor para IL-10; PAMP: patron molecular asociado a patógeno; S1P: esfingosina 1-fosfato; S1P2: receptor 2 para S1P; SCF: factor de célula madre; TGFβ: factor de crecimiento transformante beta; TGFβR1: receptor 1 para TGFβ; TLRs: receptores tipo toll.. Tomado y modificado de Gilfillan et al., 2006

1.5 Las fases temprana y tardía de las repuestas alérgicas

La activación de las células cebadas por el receptor FcεRI lleva a la liberación del contenido granular en un evento que se conocen como desgranulación. Ésta forma parte de la fase temprana de la activación en la cual están involucradas todas las sustancias preformadas que se liberan de los gránulos en respuesta a un desafío antigénico. La desgranulación comprende la salida de una variedad muy amplia de sustancias tales como péptidos antimicrobianos, sustancias vasoactivas y citocinas prefabricadas. Otro tipo de sustancias que se liberan en esta fase son los mediadores

lipídicos sintetizados *de novo* por la activación del metabolismo del ácido araquidónico (1).

Por otra parte, existe también una fase tardía en la que las células estimuladas a largo plazo puede sintetizar *de novo* y secretar diversas citocinas gracias a la activación conjunta y diferencial de los factores de transcripción que inducen la expresión de genes de citocinas. De esta manera, las citocinas pueden modular los estadios inflamatorios de las respuestas alérgicas (1 y 5).

Las citocinas secretadas por parte de las células cebadas llevan diversos mensajes y por ello poseen múltiples funciones, por ejemplo: la interleucina 6 (IL-6) puede incrementar la síntesis de IgE, mientras que la IL-8 e IL-16 sirven como quimioatrayentes de neutrófilos y linfocitos respectivamente, en tanto la IL-5 y el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) inducen el crecimiento, activación y supervivencia de eosinófilos. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) puede inducir la expresión de moléculas de adhesión endotelial, de quimiocinas del epitelio y secreción de citocinas de leucocitos (1 y 8).

Otro tipo de proteínas inducibles y secretadas por las células cebadas son las quimiocinas tales como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta y RANTES que llevan a cabo la quimiotaxis de células T, de neutrófilos, de monocitos y eosinófilos, respectivamente (8).

Dos citocinas muy importantes son IL-4 e IL-2. La función de la IL-4 está acoplada a la producción de IgE por parte de las células B, a la diferenciación de células Th2 y a la expresión de Fc ϵ RI y CD23 (1). Por su parte, la IL-2 funciona como un factor de crecimiento de células T al inducir una caída en la activación de proteínas inhibitoras

de ciclinas. En células NK y células B también induce la proliferación de estos tipos celulares (8).

En la tabla 2 se muestra un resumen de las moléculas que son liberadas durante la desgranulación, algunas de ellas son sintetizadas y liberadas en el momento del estímulo y otras están previamente almacenadas en los gránulos para ser secretadas hasta el momento de la estimulación antigénica (5).

Los eventos moleculares asociados a la activación del $Fc\epsilon RI$ y a la desgranulación, comprenden una serie de pasos donde participan diversas proteínas señalizadoras que se activan en la cascada de transducción del $Fc\epsilon RI$.

1.6 Estructura y señalización del $Fc\epsilon RI$.

El receptor $Fc\epsilon RI$ es un complejo proteico heterotetramérico compuesto por una subunidad alfa cuya función es reconocer la porción Fc de la IgE, una subunidad beta que atraviesa la membrana cuatro veces y que amplifica la señal; y dos subunidades gama unidas entre si por dos puentes disulfuro. Las cadenas beta y gama, en su porción citoplásmica, tienen motivos de fosforilación en residuos de tirosina llamados ITAMs (ver abreviaturas).

La activación del $Fc\epsilon RI$ comienza cuando dos IgEs reconocen y se unen a través de un antígeno, a dos receptores de forma independiente (entrecruzamiento) teniendo como consecuencia la activación de las cinasas de la familia Src, Lyn y Fyn. Previo a la activación del $Fc\epsilon RI$, ambas cinasas se hallan débilmente asociadas a las cadenas beta en espera de la activación del receptor (12).

Tabla 2. Productos secretados en la células cebadas.

Principales mediadores preformados y almacenados en gránulos citoplásmicos	Histamina, serotonina (en roedores murinos), sulfatos de heparina y/o sulfatos de condroitina, ptrotesasas neutrales (quimasas y/o triptasas) , proteína básica principal, muchas hidrolasas ácidas, catepsina, carboxipeptidasas, peroxidasa.
Principales mediadores lipídicos producidos por una activación definida	Prostaglandina E2 (PGE2), PGD2, Leucotrieno B4 (LTB4), LTC4, factor activador de plaquetas.
Citocinas y quimiocinas liberadas por una activación definida	TNF*, TGFβ, MIP-1α, VPF/VEGF*, FGF-2*, LIF, IFN-α, INF-β, INF-γ, GM-SCF, , IL-1α, IL-1β, IL-2**, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-25, MCP-1, MIP-1α***, MIP-1β*** y RANTES*** (y probablemente muchas más)
Péptidos anti-microbianos	Catelicidina (células cebadas humanas: LL-37, células cebadas murinas: CRAMP e)

*Diversas líneas de evidencia indican que ciertas citocinas producidas por las células cebadas, tales como factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), factor de permeabilidad vascular (VPF) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) son preformadas y almacenadas en los gránulos. Tomado de Galli et al. Annu. Rev. Immunol. 23:749-86 (2005)

**Referencia 34 y 42

***Referencia 8

1.7 La vía dependiente de Lyn

Ante el entrecruzamiento mediado por los complejos IgE-antígeno (Ag) (figura 2), la cinasa Lyn fosforila los ITAMS de las cadenas beta y gama creando fosfotirosinas que serán reconocidas río abajo por los dominios SH2 de una proteína realcionada con ZAP-70, Syk. Una vez que syk se ha translocado a los ITAMs de las cadenas gama, se activa y entonces fosforila en tirosinas a una proteína de andamiaje llamada LAT. LAT tiene múltiples sitios de fosforilación, y mediante éstos se pueden unir proteínas señalizadoras poseedoras de dominios SH2.

Una primera proteína es la enzima fosfolipasa C gamma ($PLC\gamma$) cuya función será hidrolizar al fosfatidil inositol 4, 5-bisfosfato (PIP_2) en inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) para movilizar calcio proveniente del retículo endoplásmico al interior de la célula y activar a la proteína cinasa C (PKC), respectivamente. Tanto la liberación de calcio de las pozas intracelulares como la activación de la PKC, son elementos importantes en la liberación de los gránulos citoplasmáticos (desgranulación).

Una segunda proteína que se une a LAT es GADS y junto con la $PLC\gamma$, pueden anclar a una segunda proteína de andamiaje llamada SLP76 que podrá reclutar al factor intercambiador de nucleótidos de guanina VAV.

Una tercera proteína que se halla unida a LAT es GRB2, que media la unión de SHC y SOS al complejo macromolecular. SOS, al igual que VAV, es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina y en conjunto, pueden activar la vía de RAS modulando el intercambio de guanosin bifosfato (GDP) por guanosin trifosfato (GTP). De esta forma es que se activa la vía de las MAPKKK (o RAF) para promover el metabolismo del ácido araquidónico a través de la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2) e inducir la síntesis de eicosanoides (leucotrienos (LTC) y prostaglandinas (PGL)). La vía de RAF en conjunto con la movilización de calcio y activación de la PKC, activan a una variedad de factores de transcripción para regular la expresión *de novo* de genes de citocinas (7).

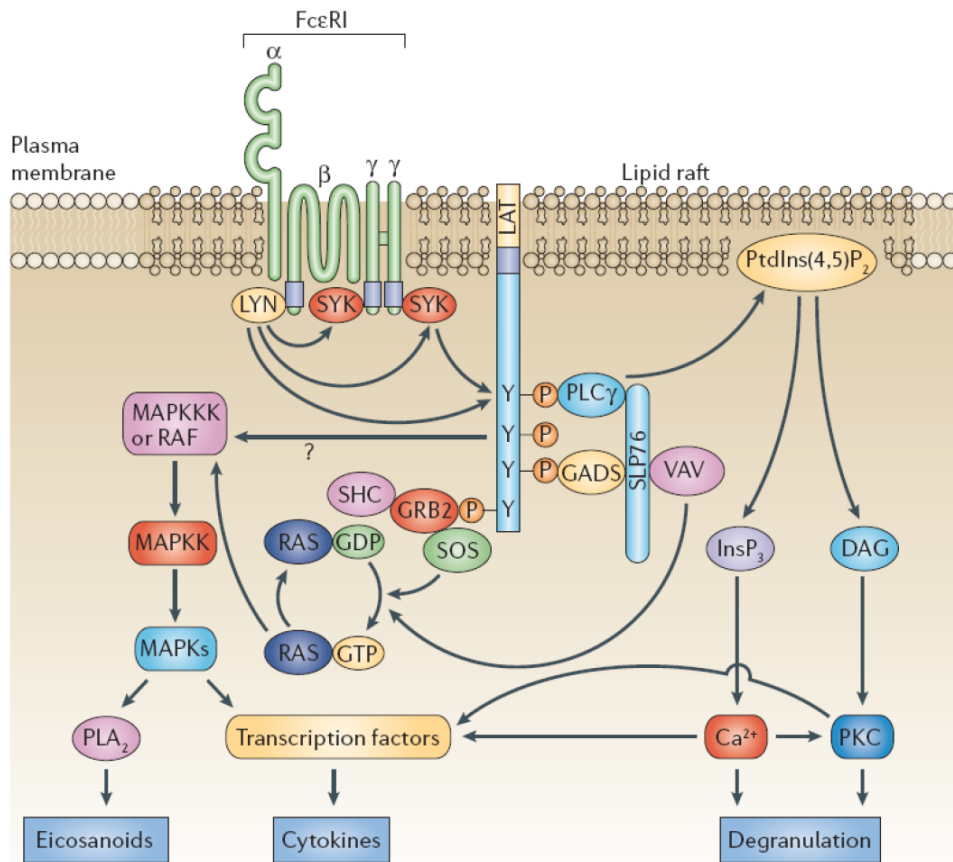


Figura 2. **Cascada de señalización principal en células cebadas activadas.** Para mayor claridad, solo se muestra un receptor de alta afinidad para IgE ($Fc\epsilon RI$). Después de la agregación del receptor $Fc\epsilon RI$, la molécula adaptadora LAT (Linker for activation of T cells) es fosforilada por la vía Lyn/Syk (spleen tyrosine kinase). LAT se une directa o indirectamente a: la molécula adaptadora citosólica GRB2 (growth-factor-receptor-bound protein 2), GADS (GRB2-related adaptor protein), SHC (SRC homology 2 (SH2)-domain-containing transforming protein C) and SLP-76 (SH2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa), así como a los factores intercambiadores VAV y SOS, y la enzima señalizadora fosfolipasa $C\gamma$ ($PLC\gamma$). De nuevo, para mayor claridad, solo un sitio de unión es representado para GRB2 y GADS. Para observar la desgranulación se requiere de la activación de la $PLC\gamma$, proteína cinasa C (PKC) y una movilización de calcio (Ca^{2+}). La generación de eicosanoides (incluyendo leucotrieno C4 y prostaglandina D2) y citocinas es inducida por la vía de las proteínas cinasa activadas por mitógeno (MAPK), RAS y RAF. Aunque la cascada es dirigida a la activación de la cinasa 1 regulada por una señal extracelular MAPK (ERK1) y ERK2 es conocido que se regulan por RAF, pero las vías que regulan las MAPK cinasas y las MAPKK cinasas que median la activación de p38 y la cinasa del amino terminal JUN (JNK) en las células cebadas no están bien definidas. DAG (diacilglicerol), $InsP_3$ (inositol-1,4,5-trifosfato), PLA_2 (fosfolipasa A2), $PtdIns(4,5)P_2$ (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato). Figura tomada de Gilfillan *et al* Nat. Rev. Immunol 6:218-30 (2006).

1.8 La vía dependiente de Fyn

Otra señal que se activa en paralelo con la vía de Lyn, es la vía de Fyn (figura 3). Fyn se halla unida débilmente a la cadena beta del Fc ϵ RI y ante el entrecruzamiento del receptor producido por IgE unida al antígeno, se activa.

Así como en la vía de Lyn participa la proteína de andamiaje LAT; evidencia reciente indica que otra proteína de andamiaje denominada NTAL es importante en la vía de Fyn. NTAL y LAT comparten una alta similitud, ya que NTAL al igual que LAT posee muchos residuos de tirosina que al ser fosforilados, podrían estar formando sitios de reconocimiento para proteínas con dominios SH2. De esta manera se ha propuesto que la proteína GRB2 se une a NTAL funcionando como intermediario de la unión de Gab2-PI3K al complejo macromolecular.

Así, Fyn activa puede fosforilar a Gab2 y promover la disociación de PI3K del complejo, para que esta última ejerza su función enzimática sobre PIP₂ y formar fosfatidil inositol 3, 4, 5- trifosfato. Por otra parte, la proteína con actividad de cinasa en tirosinas de Bruton (Btk), que posee dominios homólogos de Pleckstrina y que pertenece a la familia de cinasas TEC, puede activar a la PLC γ y así mediar la formación de IP₃ (7). La PI3K además de fosforilar al PIP₂, puede activar a la fosfolipasa D (PLD), un mediador de la activación de la Esfingosina cinasa (SK) que fosforila a la esfingosina para dar esfingosina 1-fosfato (S1P) (13). Tanto el IP₃ como la S1P pueden movilizar calcio de las pozas intracelulares al citoplasma y de esta manera promover la liberación de los gránulos citoplasmáticos (desgranulación), la activación de los factores de transcripción y la síntesis de mensajeros de citocinas.

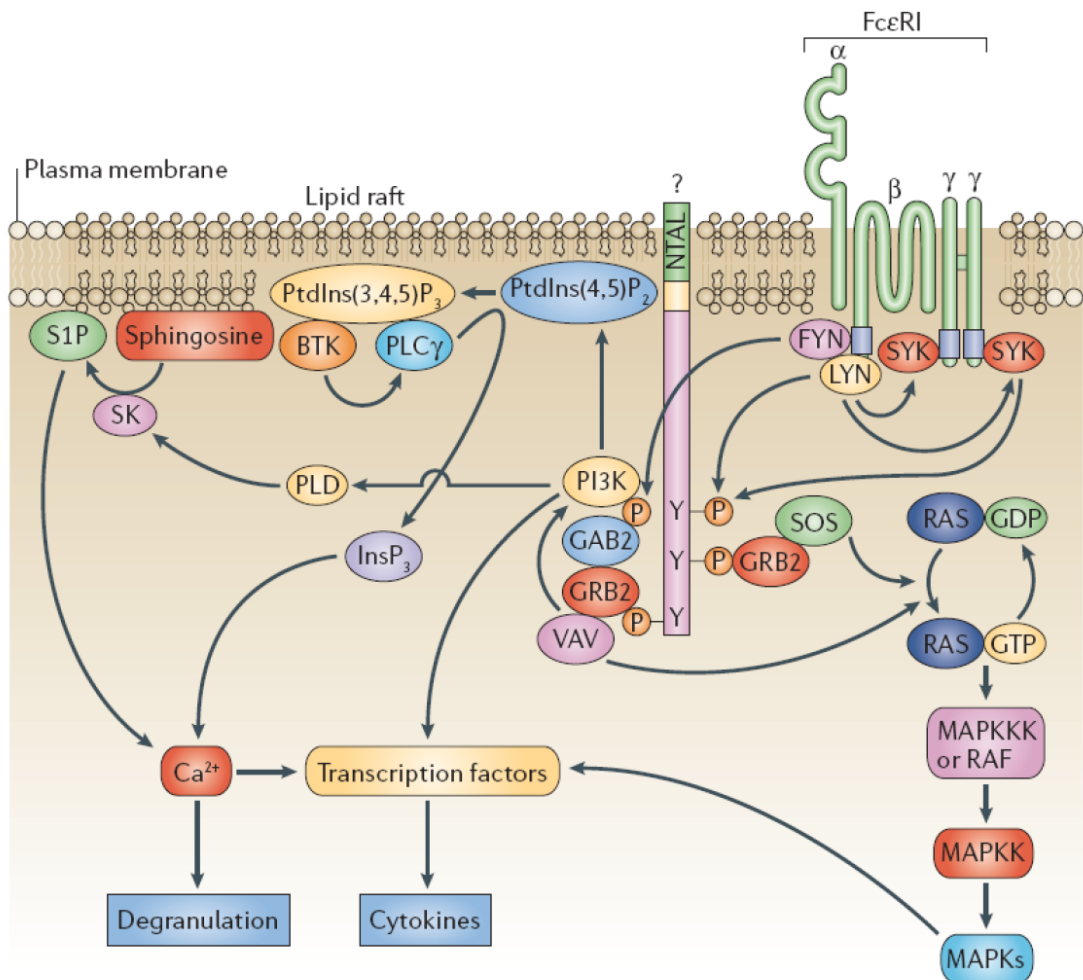


Figura 3. **Cascada de señalización complementaria en células cebadas activadas.** Para mayor claridad, solo un receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) es mostrado. Después de la agregación del FcεRI, la proteína tirosina cinasa FYN se activa, lo que culmina con la activación de la proteína adaptadora citosólica GAB2. Esto lleva a la unión de la enzima fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) por GAB2 y termina con la liberación de calcio (Ca²⁺), la cual ocurre potencialmente a través de un mecanismo de fosforilación dependiente de BTK (Bruton's tyrosine kinase) de la PLCγ. Alternativamente, PI3K incrementa la movilización de calcio por activación de la esfingosina cinasa (SK) a través de la fosfolipasa D (PLD) para formar esfingosina 1-fosfato (S1P). Aunque no ha sido bien demostrado, NTAL (non-T cell activation linker) puede coordinar estos eventos uniendo GRB2 seguido de la fosforilación de NTAL de una manera dependiente de LYN y SYK. Figura Tomada de Gilfillan *et al* Nat. Rev. Immunol 6:218-30 (2006).

1.9 Cinasas de la familia Src en células cebadas

La participación de proteínas con actividad de cinasa de residuos de tirosina (PTKs) de la familia Src es muy importante en el sistema de transducción del receptor FcεRI. Tal es el caso de Lyn y Fyn cuyas masas son de 60 kDa aproximadamente. La estructura general comprende un dominio amino terminal U, un SH3, un SH2 y uno de cinasa. El dominio U media la unión de las cinasas de esta familia con la cara interna de la membrana celular (9). Los dominios SH3 y SH2 median la unión a dominios ricos en prolina y residuos de fosfotirosina respectivamente (10); el dominio de cinasa fosforila tirosinas, creando así, dominios SH2 en otras proteínas (9 y 10). En el caso particular de Lyn, su RNA mensajero puede ser sometido a corte y empalme alternativo durante su procesamiento, por lo que la proteína puede estar presente en su forma corta o con 31 aminoácidos más en la región del dominio U. Esta proteína participa en la regulación negativa de las señales río debajo del FcεRI descritas más adelante. Otras PTKs como lo son Syk de la familia de Zap70/Syk y Btk de la familia Tec, son proteínas que también están presentes y son importantes en la señalización del FcεRI (11).

1.10 Consecuencias de la ausencia de Lyn

La participación de la cinasa Lyn es muy importante en el sistema de transducción del receptor FcεRI. En el caso de Lyn, ésta participa en la regulación negativa de las señales mediadas por el receptor FcεRI (11), ya que estudios realizados en células cebadas de ratones que carecen de Lyn muestran un marcado incremento en la desgranulación así como un incremento en la fosforilación de Gab2, una proteína adaptadora que media la fosforilación de la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3

cinasa (PI3K) aumentando también la fosforilación de PIP₂ para formar PIP₃ y activar a Akt (2 y 9).

Además, en una serie de experimentos llevados a cabo por Odom *et al.*, se encontró que en los ratones carentes de la cinasa Lyn, muchos rasgos asociados con las alergias estuvieron presentes, incluyendo grandes concentraciones de IgE en suero, incremento de histamina circulante, aumento en el número de células cebadas en la piel y en el peritoneo; así como sobreexpresión del FcεRI en las células cebadas (15).

Por otra parte, y a diferencia de lo que sucede con las células que carecen de la cinasa Lyn, la ausencia de Fyn hace que las células cebadas desgranulen muy poco (5 y 14). Estos hallazgos sugieren que la vía de la cinasa Lyn puede regular negativamente la vía de la cinasa Fyn, y que de ésta última depende la desgranulación.

1.11 Regulación negativa de Lyn sobre Fyn

Un evento molecular asociado a la participación de Lyn es la capacidad para fosforilar a la proteína Cbp presente en las balsas de lípidos de las células cebadas. El incremento en la fosforilación de Cbp, recluta a Csk, la cual sirve para controlar la cantidad de Fyn catalíticamente activa y de esta manera, controlar la desgranulación. Esta visión fue sustentada por experimentos en donde la introducción de niveles normales de Lyn en células cebadas Lyn^{-/-}, provocó una disminución en la actividad de Fyn, cuando a las células se les estimuló antigénicamente (15). Así, en células carentes de Lyn, la fosforilación de Cbp es reducida, lo que hace que haya menos Csk disponible para regular negativamente la actividad de Fyn. Todo esto tiene como resultado la fosforilación incrementada de Gab2 dirigida a la hiperactivación de la vía

Gab2/PI3-K culminando con la desgranulación (9). Esta regulación ha sido usada para explicar el incremento en la desgranulación de las células sin Lyn.

Una función más que se le ha asignado a Lyn, es la capacidad para fosforilar ITIMs, que son dominios de inhibición. Estos dominios fosforilados reclutan fosfatasa tales como SHP-1 y SHIP que en las células cebadas, apagan las señales encaminadas a la liberación de mediadores (1, 5 y 9). Algunos estudios realizados en células B sugieren que la cinasa Lyn tiene un rol regulador negativo ya que su ausencia tiene como consecuencia la pérdida de la fosforilación de diversas moléculas inhibitoras (8 y 15).

Como se mencionó anteriormente las células cebadas son capaces de censar una gran variedad de señales externas debido a que poseen receptores que les permiten tener esta habilidad. Ejemplo de ello es la activación de las células cebadas por el Fc ϵ RI que puede ser modificada por la activación de un receptor de la familia Toll llamado TLR4. Debido a esto, las células cebadas pueden integrar estímulos provenientes de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa.

1.12 Receptores tipo Toll (TLRs)

Los receptores tipo Toll (TLRs) son una familia de receptores que reconocen una variedad importante de patrones moleculares (tabla 3). Su nombre se debe a la alta similitud que este tipo de receptores presenta con el receptor Toll, cuya función está asociada al reconocimiento de hongos patógenos en *Drosophila melanogaster* (la mosca de la fruta) (16). En los mamíferos, estas proteínas reconocen patrones moleculares de algunos microorganismos asociados a algunas enfermedades (17). Sin embargo, los TLRs también pueden reconocer otro tipo de sustancias sin que necesariamente estén involucradas en la patogénesis (18). En la tabla 3 se muestran

los diferentes receptores tipo Toll descritos a la fecha y los ligandos que pueden ser reconocidos por cada uno de ellos.

Los TLRs en su porción extracelular poseen un dominio que contiene de 19 a 25 copias en tandem de motivos ricos en leucina (LRR) (figura 4). Cada repetición consiste de 24 a 29 aminoácidos presentando secuencias XLXXLXLXX o una más conservada aún XØXXØX4FXXLX, donde X denota cualquier aminoácido y Ø denota aminoácidos hidrofóbicos. Los TLRs en su tallo citoplásmico presentan un dominio TIR de aproximadamente 200 aminoácidos cuya estructura comprende tres regiones altamente conservadas conocidas como cajas 1, 2 y 3 las cuales son necesarias para la señalización. Los dominios TIR comparten por lo general una identidad del 20 al 30% y su tamaño varía dependiendo del TLR que se trate. Este dominio está presente en el receptor Toll de *Drosophila* y en el receptor para IL-1 proviniendo de ahí el nombre de TIR (Toll/IL-1R) (18).

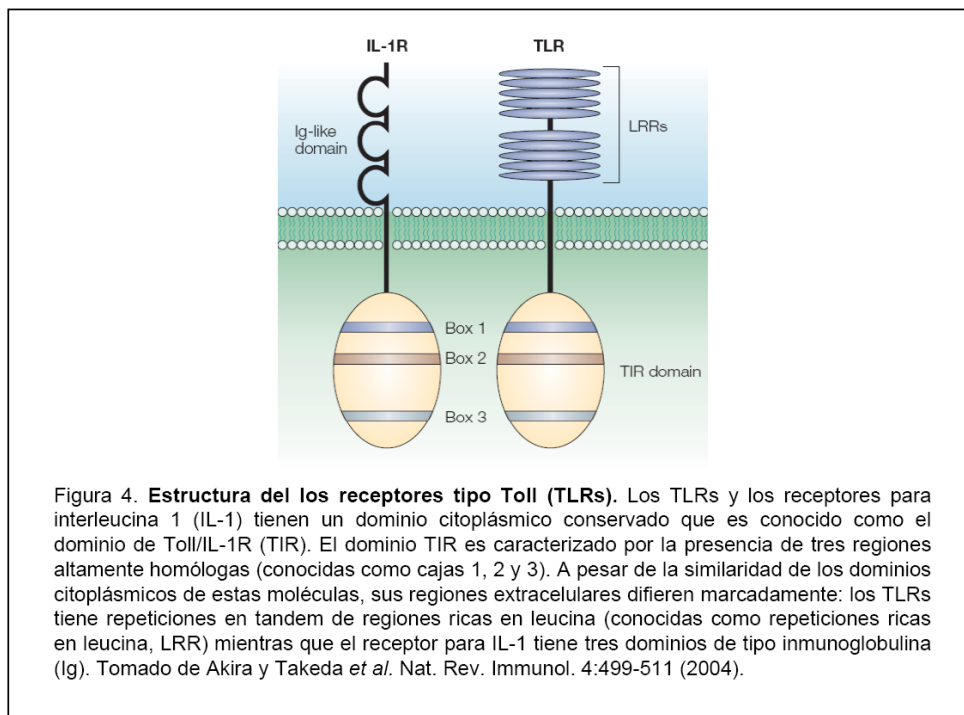
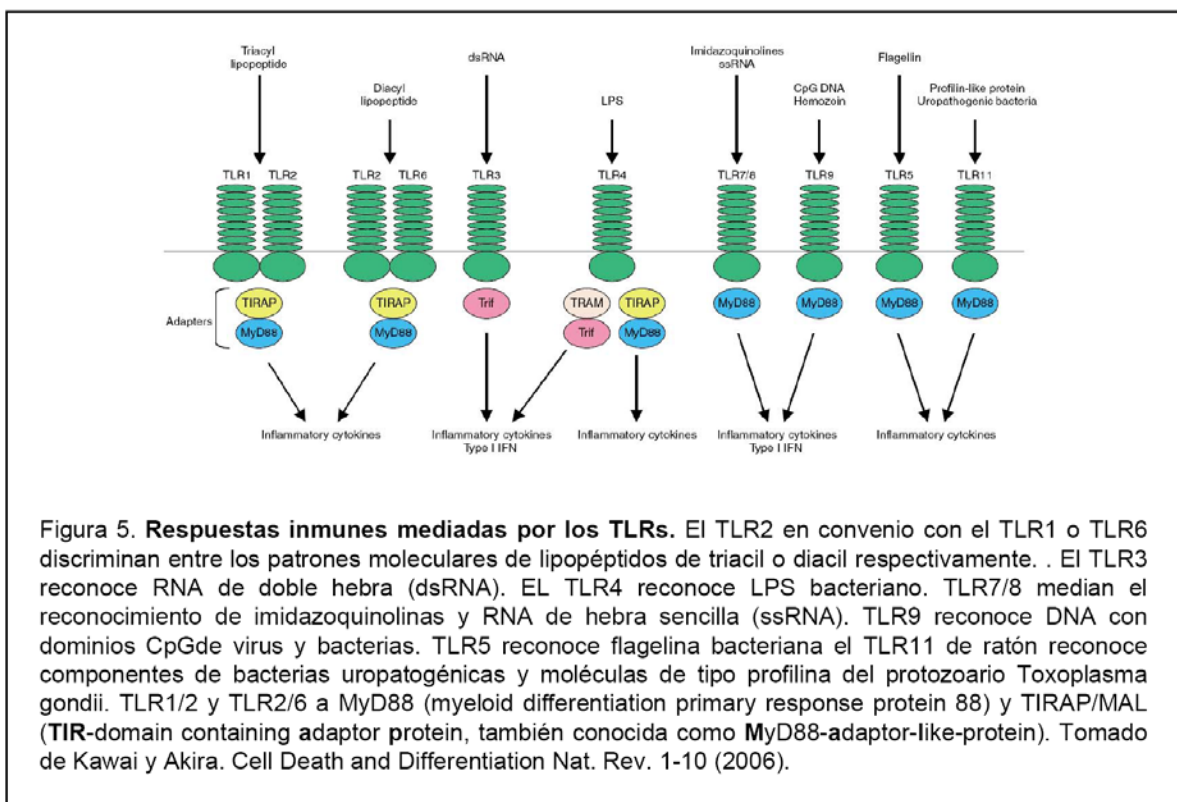


Tabla 3. Receptores tipo Toll: sus ligandos y sus orígenes

Receptor	Ligando	Origen del ligando
TLR-1	Lipopéptidos triacilados Factores solubles	Bacteria y micobacteria <i>N. meningitidis</i>
TLR-2	Lipopéptidos/lipoproteína Peptidoglicano Ácido lipoteicoico Lipoarabinomanano Modulina soluble en fenol Glicoinositolfosfolípidos Glicolípidos Porinas Lipopolisacárido atípico Lipopolisacárido atípico Zimosan Proteína de choque térmico 70*	Varios patógenos Bacterias gram positivas Bacterias gram positivas Micobacteria <i>S. epidermis</i> <i>T. cruzi</i> <i>T. maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>L. interrogans</i> <i>P. gingivalis</i> Hongos Hospedero
TLR-3	RNA de doble hebra	Virus
TLR-4	Lipopolisacárido Taxol Dioscorina** Proteína de fusión Proteína de envoltura Proteína de choque térmico 60* Proteína de choque térmico 70* Repetición tipo III del dominio A de fibronectina* Oligosacárido del ácido hialurónico Polisacárido de sulfato de heparina Fibrinógeno	Bacterias gram negativas Plantas <i>D. alata</i> Virus sincicial respiratorio Virus de tumor mamario de ratón <i>C. pneumoniae</i> Hospedero Hospedero Hospedero Hospedero Hospedero
TLR-5	Flagellina	Bacteria
TLR-6	Lipopéptidos diacilados Ácido lipoteicoico Zimosan	<i>Mycoplasma</i> Bacteria gram positiva Hongos
TLR-7	Imidazoquinolina Loxoribina Bropirimina RNA de hebra sencilla	Compuestos sintéticos Compuestos sintéticos Compuestos sintéticos Virus
TLR-8	Imidazoquinolina RNA de hebra sencilla	Compuestos sintéticos Virus
TLR-9	DNA con motivos CpG	Virus y bacterias
TLR-10	N. D.	N. D.
TLR-11	N. D.	Bacterias uropatógenas

* Es posible que éstas preparaciones de ligando, particularmente aquellas de origen endógeno, estuvieran contaminadas con lipopolisacárido u otros componentes microbianos potentes. De esta manera es que se requiere de un análisis más preciso para concluir que los TLRs reconocen éstos ligandos endógenos. ** Referencia 20. N. D., no determinado. Tomado y modificado de Akira y Takeda, 2004.

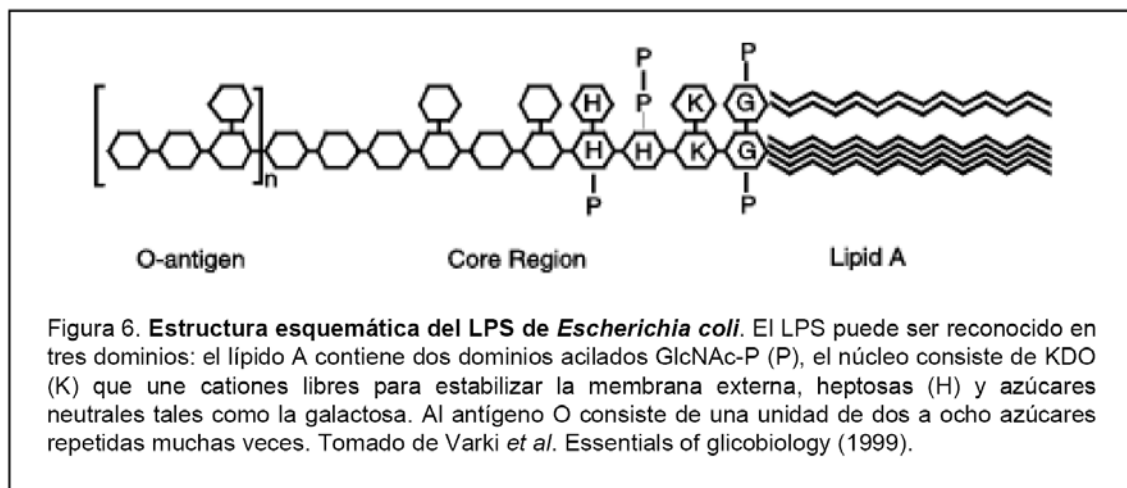
Los TLRs se asocian mediante interacciones TIR con proteínas que sirven como adaptadores que acoplan a otras proteínas para formar complejos señalizadores (figura 5). Las cascadas de activación pueden ser dependientes o independientes de MyD88. Por ejemplo, los TLR-1, 2 y 5 utilizan a las proteínas TIRAP y MyD88, en tanto que el TLR3 emplea a TRIF. Los TLR-7, 8 9 y 11 emplean únicamente a MyD88. El TLR-5 además de usar el complejo TIRAP/MyD88, también puede hacerlo solo con MyD88. El TLR-4 puede emplear la vía independiente de MyD88 que induce la participación de TRAM y TRIF, o la vía que comprende a MyD88/TIRAP (19).



1.13 Un ligando para el TLR4: el Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) es un lípido glucosilado asociado a la membrana externa de las bacterias gram-negativas tal como *Escherichia coli* (figura 6). Su estructura comprende dos azúcares glucosaminadas unidas a tres fosfatos y seis tallos de ácidos grasos los cuales anclan al LPS con la membrana externa de las bacterias gram negativas. La estructura básica comprende largas cadenas de azúcares usualmente

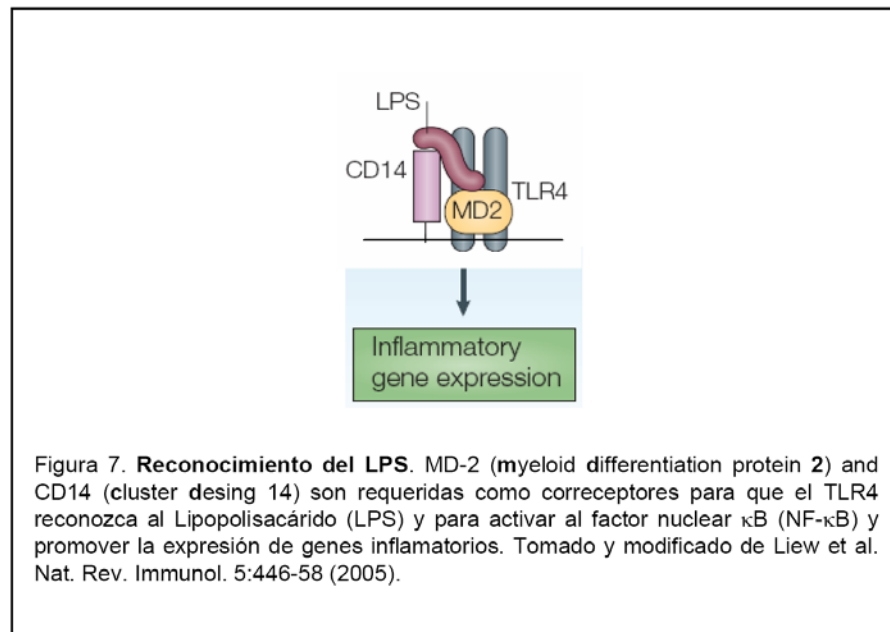
muy ramificadas, además de contener dos moléculas de azúcar denominadas ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico. Posee además un núcleo, el cual une a ocho de las veinte azúcares que se pueden unir en este lugar. Este sitio además puede albergar al antígeno O el cual es muy largo y se compone por una unidad de oligosacáridos que está repetida más de cuarenta veces. Tanto el núcleo sacárido como el antígeno O, son las regiones que varían de una cepa a otra en las diferentes especies de bacterias gram negativas, siendo todas altamente inmunogénicas (21 y 22).



1.14 Señalización del TLR4

La molécula que en primera instancia ayuda al reconocimiento del LPS es la proteína de unión al LPS (LBP). Enseguida de la asociación LBP-LPS, se une una proteína membranal llamada CD14 y el complejo formado presenta al LPS con el TLR4 a través de dominios ricos en leucina (LRR) que este último posee. El complejo formado con ayuda de una última proteína llamada MD-2 permitirá la transducción de la señal del LPS hacia el interior de la célula. Existe una vía canónica que comprende la participación de diversas proteínas intracelulares, sin embargo existen vías alternas

que pueden llevar al mismo propósito: la expresión genética de citocinas proinflamatorias (23) (figura 7).



El TLR4 (receptor tipo toll 4), así como el Fc ϵ RI, está embebido en la membrana celular de las células cebadas. En general, los receptores de ésta familia, son receptores conservados a través de la evolución participando en la respuesta del hospedero frente a microorganismos mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (24). Las señales río abajo tienen como consecuencia la activación del complejo IKK que secuestra al inhibidor de NF- κ B (I κ B) para entonces promover la síntesis de RNA mensajero y proteínas involucradas en la respuesta inmune innata. Los dominios asociados a estos adaptadores son esenciales ya que pueden mediar muchas interacciones moleculares. Es así como la activación de factores de transcripción ejercen su función sobre regiones específicas del genoma, induciendo la expresión de diferentes genes que *a posteriori* formarán parte de la defensa del hospedero frente a los microorganismos (25).

1.15 La vía dependiente de MyD88

Una vez que el LPS ha transducido su señal al interior de la célula, una proteína llamada MyD88 se une a través de su dominio TIR con el dominio TIR del TLR4 (figura 8). MyD88 es una proteína adaptadora que requiere de una proteína llamada TIRAP para asociarse con las cinasas de serina/treonina llamadas IRAKs (18) (figura 9). IRAK4 fosforila a IRAK1 permitiendo que ésta última se asocie a TRAF6 (18 y 19). TRAF6 interacciona con la Ubiquitina Ligasa UBC13 y con la proteína conjugadora de ubiquitina UEV1A para poder activar al complejo formado por TAK1, TAB1, TAB2 y TAB3 y fosforilar a las MAP cinasas, y al complejo IKK que desactiva al Inhibidor de NF- κ B ($I\kappa$ B) permitiendo que NF- κ B pueda viajar hasta el núcleo e inducir la transcripción de genes de citocinas (18). La activación de las MAP cinasas involucra la actividad de MKK3, MKK6 y MEK2, las cuales activan subsecuentemente a JNK, p38 y ERK. Esta actividad mediada por las MAP cinasas culmina con la activación del factor de transcripción AP-1 (Jun y Fos) (19).

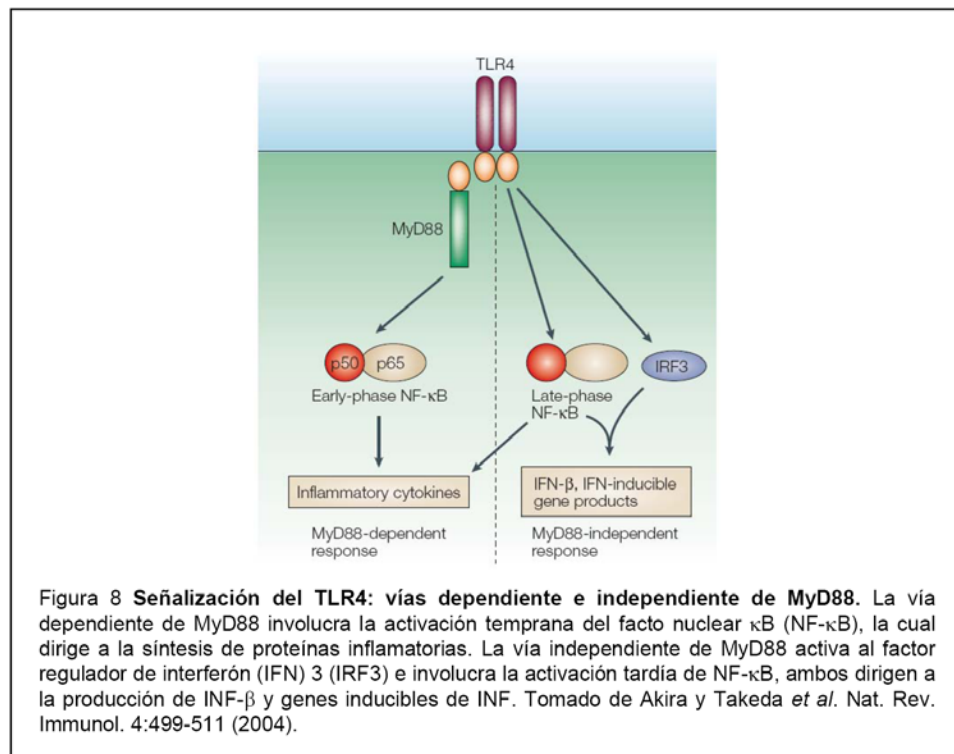


Figura 8 Señalización del TLR4: vías dependiente e independiente de MyD88. La vía dependiente de MyD88 involucra la activación temprana del factor nuclear κ B (NF- κ B), la cual dirige a la síntesis de proteínas inflamatorias. La vía independiente de MyD88 activa al factor regulador de interferón (IFN) 3 (IRF3) e involucra la activación tardía de NF- κ B, ambos dirigen a la producción de IFN- β y genes inducibles de IFN. Tomado de Akira y Takeda *et al.* Nat. Rev. Immunol. 4:499-511 (2004).

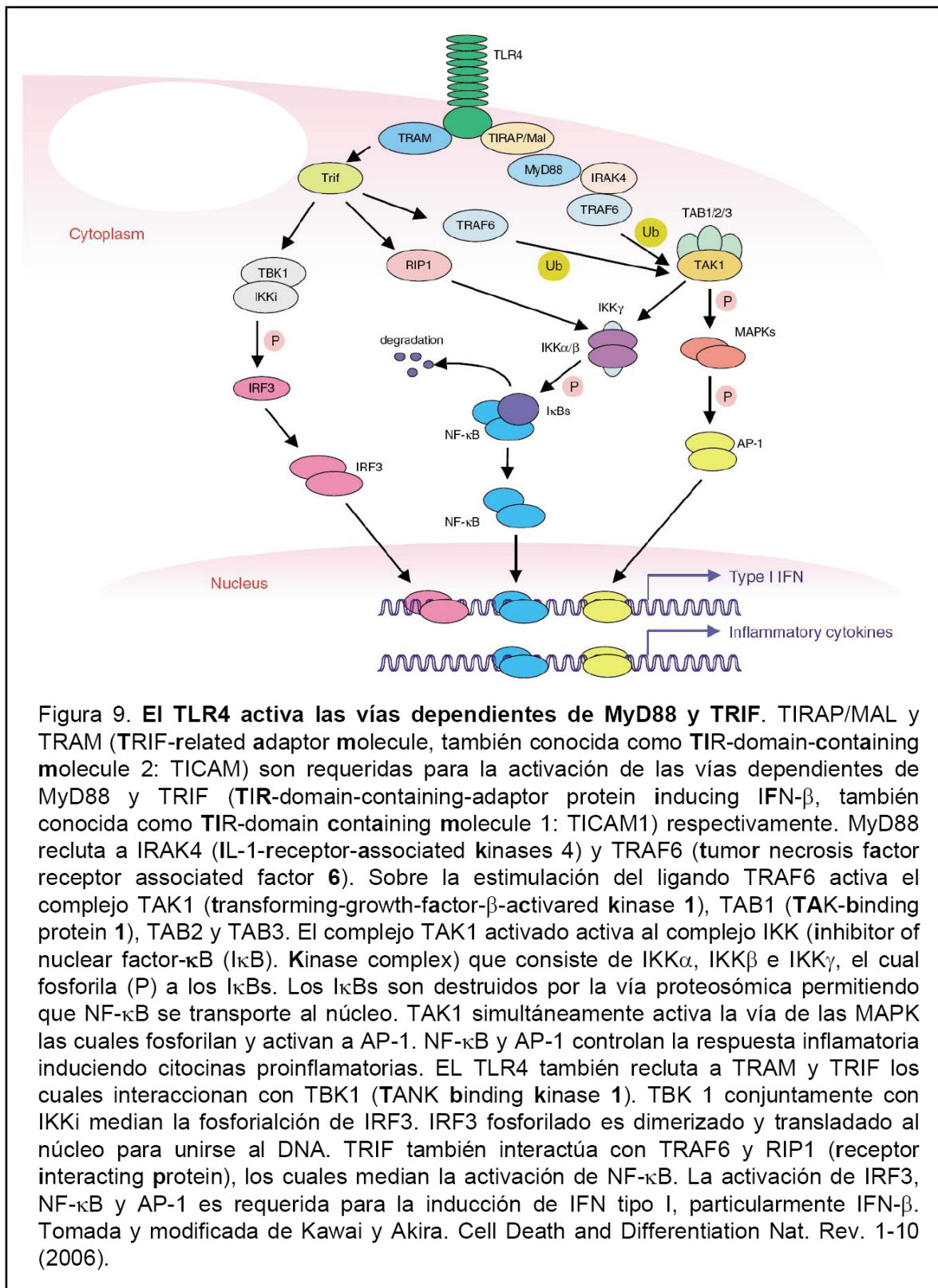


Figura 9. El TLR4 activa las vías dependientes de MyD88 y TRIF. TIRAP/MAL y TRAM (TRIF-related adaptor molecule, también conocida como TIR-domain-containing molecule 2: TICAM) son requeridas para la activación de las vías dependientes de MyD88 y TRIF (TIR-domain-containing-adaptor protein inducing IFN- β , también conocida como TIR-domain containing molecule 1: TICAM1) respectivamente. MyD88 recluta a IRAK4 (IL-1-receptor-associated kinases 4) y TRAF6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6). Sobre la estimulación del ligando TRAF6 activa el complejo TAK1 (transforming-growth-factor- β -activated kinase 1), TAB1 (TAK-binding protein 1), TAB2 y TAB3. El complejo TAK1 activado activa al complejo IKK (inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B). Kinase complex) que consiste de IKK α , IKK β e IKK γ , el cual fosforila (P) a los I κ Bs. Los I κ Bs son destruidos por la vía proteosómica permitiendo que NF- κ B se transporte al núcleo. TAK1 simultáneamente activa la vía de las MAPK las cuales fosforilan y activan a AP-1. NF- κ B y AP-1 controlan la respuesta inflamatoria induciendo citocinas proinflamatorias. EL TLR4 también recluta a TRAM y TRIF los cuales interactúan con TBK1 (TANK binding kinase 1). TBK 1 conjuntamente con IKKi median la fosforilación de IRF3. IRF3 fosforilado es dimerizado y trasladado al núcleo para unirse al DNA. TRIF también interactúa con TRAF6 y RIP1 (receptor interacting protein), los cuales median la activación de NF- κ B. La activación de IRF3, NF- κ B y AP-1 es requerida para la inducción de IFN tipo I, particularmente IFN- β . Tomada y modificada de Kawai y Akira. Cell Death and Differentiation Nat. Rev. 1-10 (2006).

1.16 La vía independiente de MyD88

Una vía paralela a la de MyD88, es la vía de TRIF. TRIF es un adaptador que contiene dominios TIR y su activación requiere de otro adaptador llamado TRAM (24). TRIF se une a RIP1 para promover la actividad de NF- κ B a través de la activación del complejo IKK. Sobre la activación de TRIF, se pueden activar factores reguladores de interferon (IRF) 3 y 7, los cuales a su vez fosforilan a complejos IKK no convencionales como IKK ϵ o TBK1 para desembocar en la activación de NF- κ B y ATF2/c-Jun y promover la expresión de IFN- β (figuras 8 y 9).

1.17 Comunicación cruzada

La comunicación cruzada (crosstalk) se refiere a un proceso en el cual una vía de señalización puede tener influencia sobre otra(s) vía(s). Esto se da por que al interior de la célula existen componentes moleculares que pueden ser compartidos por varias vías activadas por diferentes ligandos. Sin embargo, no todas las vías que se pueden activar en una célula tienen que estar necesariamente asociadas. En el caso de la célula cebada, un claro ejemplo de comunicación cruzada existe cuando las células son tratadas con LPS para activar la vía del TLR-4 y con IgE para activar la vía del Fc ϵ RI, y ver los distintos parámetros de activación en respuesta a la estimulación por separado y conjunta de ambos ligandos (25).

Existen diversos artículos en los que se han hecho experimentos con tales moléculas (IgE y LPS) y se han encontrado resultados interesantes. Uno de ellos es el de Masuda *et al.*, donde los resultados revelaron que el LPS y el estímulo antigénico mediado por IgE unido a Fc ϵ RI, promueve sinérgicamente la síntesis y secreción de interleucinas tales como IL-5, IL-10 e IL-13. Asimismo, cuando las células cebadas

fueron estimuladas antigénicamente, en ausencia del LPS; y estimuladas por LPS en ausencia del estímulo antigénico, la síntesis y secreción de citocinas decrecieron considerablemente en ambos casos. Es así que este trabajo provee evidencia sobre el efecto dual y sinérgico que el Fc ϵ RI y el TLR4 que pueden tener sobre la activación de las células cebadas (25)

.

Otro estudio hecho por Nigo *et al.*, reveló que la infiltración eosinofílica en pulmón murino puede verse inducida mayoritariamente cuando a los ratones se les administra cantidades considerables de antígeno (OVA) y LPS. Experimentos posteriores revelaron que no solo se necesita activar la señalización del Fc ϵ RI y el TLR-4 para observar la infiltración eosinofílica en pulmón murino, si no que, además, dicha activación tiene que estar mediada por las células cebadas residentes en las vías aéreas de los ratones utilizados. En este trabajo también se vio que el LPS puede inducir la secreción de TNF- α en las células cebadas y que el LPS en conjunto con la activación del Fc ϵ RI pueden mejorar la síntesis de mensajeros tales como los de IL-5, IL-13 y Eotaxina 2. En este mismo estudio se detectó la activación de factores de transcripción tales como NF- κ B, AP-1, GATA1 y GATA2 en células cebadas activadas con LPS (26).

Elementos que se activan en la vía del TLR4 y que participan en la estimulación antigénica, fueron reportados en un trabajo hecho por Furumoto *et al.*, al observar que la subunidad beta del receptor Fc ϵ RI puede regular la fosforilación de MAPK e I κ B. En estos experimentos se mutaron residuos de tirosinas por fenilalaninas en la subunidad beta del receptor y el resultado fue la sobreexpresión en la síntesis de citocinas tales como IL-6, IL-13 y TNF- α (27).

Desde hace varios años se ha venido caracterizando el papel de las células cebadas en los mamíferos y se ha encontrado que este tipo celular puede desarrollar respuestas de inmunidad innata. Esta visión ha sido sustentada en experimentos donde se ha visto que los agentes bacterianos inducen la síntesis de TNF- α en la cavidad peritoneal y que la fuente de origen de esta citocina son las células cebadas, ya que, al utilizar ratones sin células cebadas, los niveles decaen significativamente respecto a los ratones silvestres o a los ratones sin células cebadas reconstituidos con células cebadas (28).

Es claro que las células cebadas tienen un papel fundamental en las reacciones alérgicas. Sin embargo, las células cebadas pueden tener una influencia importante en la regulación de la respuesta innata en contra de infecciones bacterianas. Incluso se piensa que la señalización inducida por endotoxina (LPS), puede modular la enfermedad inflamatoria alérgica (29). Las células cebadas pueden integrar respuestas dadas por estímulos de la inmunidad innata y por la inmunidad adaptativa, por lo que su estudio ayudaría a establecer la relación existente entre las enfermedades alérgicas y las infecciones bacterianas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Averiguar el papel que la cinasa Lyn juega en los efectos de la endotoxina LPS, sobre el sistema de transducción del receptor FcεRI en las células cebadas.

2.2 Objetivos particulares:

- a) Caracterizar el papel de la cinasa Lyn en la desgranulación antigénica de las células cebadas en presencia de LPS.
- b) Caracterizar el papel de la cinasa Lyn en la síntesis de citocinas inducida antigénicamente en presencia de LPS.

3. HIPÓTESIS

- La cinasa Lyn acoplada al receptor FcεRI tendrá un papel relevante en las modificaciones que la vía inducida por el LPS ejerza sobre las células cebadas activadas antigénicamente.

4. MATERIALES Y MÉTODO

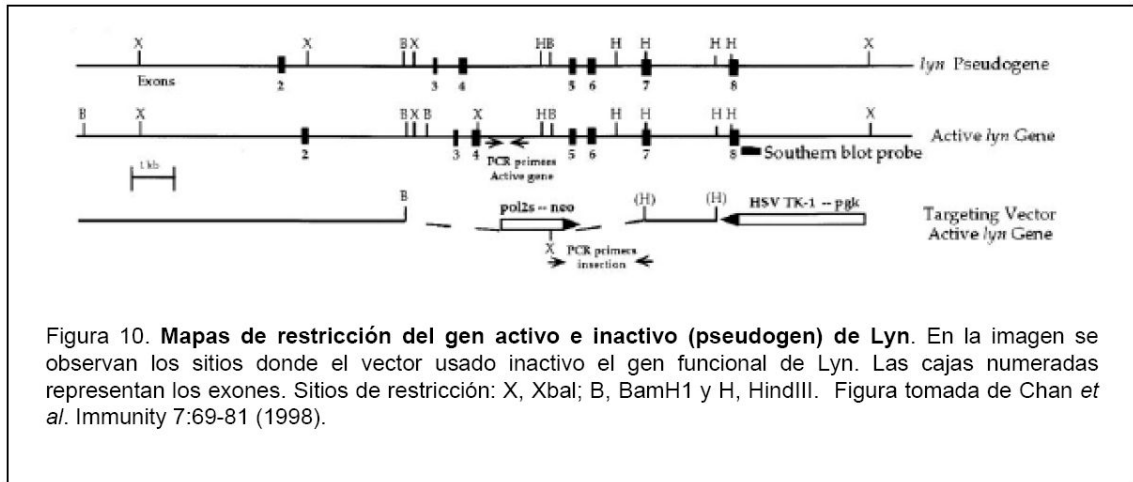
4.1 RATONES

Los ratones utilizados en este trabajo pertenecen a la cepa 129s1/Sv1Jm y presentan un color de pelo agouti. En todos los experimentos, se tomaron ratones de 8 semanas de edad en promedio comprobando previamente su genotipo. Los ratones tipo silvestre ($Lyn^{+/+}$) y los ratones carentes de la cinasa Lyn ($Lyn^{-/-}$) son ratones libres de patógenos. Los ratones $Lyn^{-/-}$ son el producto de la manipulación genética del gen *Lyn* al cual se le anuló su funcionalidad.

4.1.1 Generación de ratones $Lyn^{-/-}$

En los ratones existen dos loci del gen que codifica para la proteína Lyn, uno de los cuales es totalmente activo y el otro no por lo que se le denomina pseudogen (figura 10). Para eliminar la funcionalidad del gen activo de Lyn, se hicieron construcciones con el gen de resistencia a neomicina (caset NEO) insertado en un vector de expresión pol2s. Tal construcción daña la secuencia del gen Lyn entre los exones 3 y 7. Una vez que se tiene la construcción, el vector se introduce en células troncales embrionarias de ratón a través de electroporación. Las células embrionarias que hayan sido exitosamente transfectadas (esto es, que se les haya insertado la construcción en su genoma) y que hayan pasado por un proceso llamado recombinación homóloga, serán resistentes a un medio de cultivo enriquecido con neomicina (es decir, que el caset de NEO se introdujo entre los exones 3-7 del gen de Lyn). Una vez que se han seleccionado las células resistentes, estas son introducidas en blastocitos de ratón para ser introducidos en una hembra de ratón previamente pseudopreñada. La progenie resultante será heterocigota para el gen que ha sido modificado, es decir, tendrá un gen activo y otro dañado. No obstante el posterior apareamiento de dos

ratones heterocigotos para el gen dañado, dará una progenie donde por segregación mendeliana existirán ratones homocigotos para tal característica, es decir, ratones que tienen los dos alelos del gen *Lyn* afectados (ratones *Lyn*^{-/-}) (1 y 30).



4.2 GENOTIPIFICACIÓN

4.2.1 Purificación de DNA

Para confirmar el genotipo de los ratones, se les cortó un centímetro del extremo de la cola. Las colas fueron puestas en tubos de rosca de 1.5 ml y se les añadió 1 ml de amortiguador SNET para mantenerlas toda la noche en un baño a 57°C y en agitación. Al día siguiente se tomaron 750 µl del sobrenadante de cada digestión y se pasaron a otro tubo nuevo para añadirles 750 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol (25:24:1). Se les agitó en un vortex durante 30 segundos y se les centrifugó a 15 000 rpm a 4°C por 15 minutos. De cada muestra, se tomó 600 µl de la fase acuosa y se les agregaron 600 µl de isopropanol para mezclarlas por inversión en un tubo nuevo y mantenerlas 15 minutos en hielo seco y enseguida centrifugarlas 15 minutos a 15 000 rpm a 4°C. Posterior a la centrifugación, a las pastillas formadas en el fondo de cada tubo, se les retiró el sobrenadante y se les

agregó 1ml de etanol al 70% frío, se les mezcló por inversión, se colocaron en hielo seco durante 5 minutos y se les centrifugó a 4°C a 15 000 rpm por 15 minutos. Después de este tiempo, el sobrenadante fue retirado por completo de las pastillas y las muestras fueron secadas a temperatura ambiente hasta no detectar ningún solvente (aproximadamente 15 minutos). Finalmente, se les agregó 25µl de agua tratada con DEPC. Para cuantificar la cantidad de DNA, se tomaron 2µl y se disolvieron en 98µl de agua con DEPC y se leyeron en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 260 y 280 nanómetros. Después de esto, los genes Lyn, en el caso de las células Lyn^{+/+} y el inserto (caset) de neo en el caso de las células lyn^{-/-}, fueron sometidos a 35 ciclos de replicación. (ver amplificación de DNA).

4.2.2 Amplificación del DNA

Para llevar a cabo la confirmación de los genotipos, se hizo lo siguiente: en tubos de 0.5 ml se puso 1µl de DNA de cada muestra. A cada uno de éstos tubos se les agregó 0.96 µl de buffer para PCR 10X sin Mg, 0.96 µl de dNTP mix 2.5 mM, 1.2 de MgCl₂ 25 mM, 0.3 µl de primer sentido 10 µM (oligo up Lyn y Neo), 0.3 µl de primer antisentido µM (oligo down Lyn y Neo), 0.03 µl de Taq DNA polimerasa y 5.65 µl de agua. Posteriormente, se metieron las muestras a un termociclador y se sometieron a 35 ciclos en el programa LYN KO bajo el siguiente programa: Ciclo 1: 94°C, 3 min. Ciclo 2: 94°C, 30 seg. Ciclo 3: 58°C, 4 min. Ciclo 4: 72°C, 1 min. Ciclo 5: ir a 1, rep 35 veces. Ciclo 6: 72°C, 2 min. Ciclo 7: detener 10°C. Fin. Después de esto las muestras fueron corridas por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (figura 11).



Figura 11. **Gel representativo de la genotipificación.** Se extrajo el DNA para después amplificar los genes de Lyn y Neo. Los ratones tipo silvestre ($Lyn^{+/+}$) muestran una banda de 340 pares de bases (pb) y los ratones carentes de la cinasa Lyn ($Lyn^{-/-}$) muestran una banda de 280 pb.

4.3 CULTIVOS

4.3.1 Extracción de células cebadas de médula ósea de ratones $Lyn^{-/-}$ y $Lyn^{+/+}$

Para obtener células cebadas derivadas de médula ósea (BMMCs) de ratón se llevó a cabo el siguiente protocolo: se sacrificaron dos ratones en una cámara con éter y se les humedeció el abdomen y la tibia con etanol al 70 %. Se les removió la piel de la tibia. Después, se les cortó la epífisis distal y proximal de la tibia sin exponer la médula ósea y se colocaron en una caja petri. A éstas se les separó el músculo del hueso para cortarlo con tijeras estériles por debajo de ambas epífisis. Para exponer la médula ósea se dejaron pasar lentamente 3 ml de medio RPMI (perfusión) a cada lado del hueso con ayuda de una jeringa de 1 ml (con aguja de 27 x 13 mm) y se colectó el medio en otra caja petri estéril.

4.4 TRATAMIENTOS

4.4.1 Tratamiento de células cebadas derivadas de médula ósea

Cuando los cultivos cumplieron cuando menos 4 semanas de edad, se contó y tomó el número de células a utilizar, se vertieron en tubos cónicos de 15 ó 50 ml y se sensibilizaron células Lyn^{+/+} con IgE anti-DNP monoclonal con (18 millones) y sin (18 millones) una preincubación con LPS. De la misma manera, se preincubaron células Lyn^{-/-}. Para ambos tipos celulares se preincubaron células en presencia de LPS en medio sin IgE (ver tabla 4). Después, se metieron las células en una incubadora a 36°C durante 18 horas.

Tabla 4. Tratamientos con los que se preincubaron a las células Lyn^{+/+} y lyn^{-/-}.

Células/ Tratamientos	Lyn ^{+/+}	lyn ^{-/-}
A: IgE*	18 millones	18 millones
B: IgE* + LPS	18 millones	18 millones
C: LPS	3 millones	3 millones

*Se hicieron experimentos con dos concentraciones de IgE: 200 y 600 ng/ml. La concentración de LPS que se utilizó fue de 100 ng/ml. En ambos casos se hicieron 6 experimentos.

4.5 ENSAYOS DE DESGRANULACIÓN

4.5.1 Determinación de β - Hexosaminidasa en células cebadas Lyn^{+/+} y Lyn^{-/-}

Una hora antes de que se cumpliera el tiempo de preincubación, en una gradilla se colocaron 8 tubos de 1.5 ml por tratamiento para colocar a las células Lyn^{+/+} + IgE con y sin LPS; y a las células Lyn^{-/-} + IgE con y sin LPS. En ellos se añadieron

concentraciones crecientes del antígeno DNP-HSA (Dinitrophenol- Human Serum Albumin), haciéndose todo en frío (tabla 5).

Después de las 18 horas, las células se sacaron de la incubadora y se centrifugaron a 1, 500 rpm durante 5 minutos a 24°C. Se quitó el sobrenadante y con lo que quedó de medio, se agitó el paquete celular (pastilla) para disgregar a las células. Entonces se resuspendió el paquete celular con buffer Tyrode's/BSA a 37°C hasta un volumen de 9 ml por tubo para llegar a la relación de 2 millones de células por ml. Así, de cada uno de los tubos cónicos, se extrajo un ml de muestra para agregárselo a cada uno de los tubos de 1.5 ml de cada tipo celular con su tratamiento correspondiente. Además, se hicieron dos controles en ausencia de antígeno. El primero sirvió para que el sobrenadante (0% de desgranulación) y la pastilla (100% de desgranulación) fueran utilizadas para determinar la intensidad de la respuesta de los ensayos tratados con DNP-HSA (ver tabla 5). El segundo control fue guardado para detectar la síntesis de citocinas (Ver RT PCR). Hecho esto, se incubaron los tubos durante una hora. Después se sacaron y se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se vaciaron los sobrenadantes en tubos de 1.5 ml nuevos previamente etiquetados y las pastillas se guardaron en un ultracongelador REVCO a -70 °C para un posterior tratamiento (ver purificación de ARN).

Tabla 5. Ensayos y tratamientos

Ensayos Células tratamientos	control		DNP-HSA					
Lyn ^{+/+} + IgE	0	0	1	3	9	27	81	243
Lyn ^{+/+} + IgE + LPS	0	0	1	3	9	27	81	243
Lyn ^{-/-} + IgE	0	0	1	3	9	27	81	243
Lyn ^{-/-} + IgE + LPS	0	0	1	3	9	27	81	243

Los números representan los nanogramos por mililitro (ng/*ml) de antígeno (DNP-HSA) con los que se trató a las células.

Del sobrenadante se extrajeron 60µl de cada tubo y se pusieron en orden en los pozos de una placa de ELISA. Después se agregó 30µl de sustrato PNAG (**p**-nitrofenil-beta-D-2-acetamido-2-desoxiglucopiranósido: sustrato para la β -Hexosaminidasa) a cada uno de los pozos antes mencionados. Se incubó la placa por una hora a 37°C y después a cada pozo se le adicionó 120 µl de una solución de paro de la actividad enzimática ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{Na}_2\text{HCO}_3$), la cual hace que se desarrolle una coloración amarilla cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de la β -Hexosaminidasa. Entonces se metió la placa a un espectrofotómetro para medir la densidad óptica a 405 nm.

4.6 TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

4.6.1 Purificación de RNA

Las pastillas celulares de cada uno de los ensayos de desgranulación y los controles se descongelaron para agregarles 0.5 ml de solución de lisis TRI-Reagent. Con ayuda de la pipeta se pasó el contenido a un tubo nuevo de rosca de 1.5 ml, en donde posteriormente se les agregó 200 μ l cloroformo para crear un medio hidrofóbico y extraer los ácidos nucleicos. Se mezcló con el vortex y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Pasados los 15 minutos se centrifugaron a 14, 000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posterior a este tiempo, se extrajeron 400 μ l de la fase acuosa y se vertieron en otro tubo de 1.5 ml con 3 μ l de glucógeno previamente puestos, para agregarles 500 μ l de isopropanol, se mezclaron suavemente y se dejaron reposar durante 10 minutos. Después de esto, se centrifugaron a 14, 000 rpm por 10 minutos a 4°C. En este punto se formó una pastilla a la que se le quitó todo el sobrenadante con ayuda de una bomba de vacío hasta dejarla seca. Las pastillas se resuspendieron, sin disociarlas, con 1 ml de etanol al 75% con agua tratada con DEPC. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 14, 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Entonces se les retiró el etanol con la bomba de vacío y se dejó secando durante 10 minutos. Se les adicionó 15 μ l de una solución protectora del RNA, RNASecure, y se les calentó a 60°C durante 10 minutos. Las lecturas sobre la concentración de RNA se hicieron con un biofotómetro a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

4.6.2 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se hizo de acuerdo al protocolo del Kit Super Script, First Strand, Synthesis System for RT-PCR, de Invitrogen, como sigue: se colocó en tubos nuevos y estériles de 1.5 ml la cantidad de 5 μ g de RNA, 1 μ l dNTP mix 10 mM, 1 μ l de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0.5 μ g/ μ l) y agua DEPC hasta alcanzar un volumen de 10 μ l. Se incubaron las muestras a 65°C por 5 minutos y después de este tiempo se colocaron sobre hielo cuando menos 1 minuto.

Después se les agregó a cada tubo, 2 μ l de buffer RT 10X, 4 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de DTT 0.1 M y 1 μ l de inhibidor recombinante de RNAsa, para incubarse a 42°C durante 2 minutos. Pasado este tiempo, se les agregó 1 μ l de RT Super Script II a cada tubo para incubarlos por 50 minutos a 42°C. Posteriormente, las muestras se colocaron 70 °C por 15 minutos para terminar la reacción y después se mantuvieron en hielo. Como paso final, a cada tubo se le adicionó 1 μ l de RNAsa H y se le incubó a 37 °C durante 20 minutos.

4.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.7.1 Amplificación de cDNA

La amplificación de cDNA se hizo de acuerdo al protocolo del Kit Super Script, First Strand, Synthesis System for RT-PCR, de Invitrogen, como sigue: En tubos estériles de 0.5 ml se pusieron 4 μ l de cDNA para cada ensayo. A cada uno de éstos tubos se les agregó 5 μ l de buffer para PCR 10X sin Mg, 1 μ l de dNTP mix 10 mM, 1.5 de MgCl₂ 50 mM, 1 μ l de primer sentido 10 μ M, 1 μ l de primer antisentido 10 μ M, 0.4 μ l

de Taq DNA polimerasa y agua destilada hasta alcanzar un volumen de 50 μ l. Posteriormente, se metieron las muestras a un termociclador y se sometieron a 35 ciclos en el programa CYTOKINE. Las condiciones del programa fueron las siguientes: Ciclo 1: 96°C, 3 min. Ciclo 2: 96°C, 1 min. Ciclo 3: 60°C, 4 min. Ciclo 4: ir a 2, rep. 1 vez Ciclo 5: 94°C, 1 min. Ciclo 6: 60°C, 2.5 min. Ciclo 7: 72°C, 4 min. Ciclo 8: ir a 5, repeat 34 veces. Ciclo 9: 70°C, 10 min. Ciclo 10: detener 4°C. Fin. Después de esto las muestras fueron corridas en una electroforesis.

4.8 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

En tubos de 0.5 ml se colocaron 2 μ l de colorante 6X y se mezclaron con 10 μ l de cada muestra amplificada. Las muestras se pusieron en los pozos del gel de agarosa al 2% después de colocar 10 μ l de una mezcla de fragmentos de distintos tamaños (en pares de bases) de DNA en el primer pozo el cual sirvió como referencia del tamaño del gen amplificado. La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder a 50 voltios y después de 90 minutos aproximadamente se retiró el gel de la cámara y se tiñó con 40 μ l de Bromuro de etidio por 15 minutos para tomarle fotografías en un analizador de imágenes.

4.9 ENSAYOS DE ELISA

4.9.1 Estimulación prolongada de células cebadas

Para inducir la secreción de citocinas en las células cebadas, se preincubaron células Lyn^{+/+} y Lyn^{-/-} durante 18 horas a 37°C (tabla 6).

Tabla 6. Número de células preincubadas para los ensayos de ELISA

	células Lyn^{+/+}	Células Lyn^{-/-}
IgE (600ng/ml)	10 millones	10 millones
IgE + LPS (100ng/ml)	10 millones	10 millones
LPS	5 millones	5 millones

Al día siguiente, se preparó un medio de cultivo enriquecido con inhibidores de proteasas. Las células fueron sacadas de la incubadora y colocadas en tubos cónicos de 15 ml para centrifugarlas durante 5 minutos a 1500 rpm. Después de esto, se les retiró el medio y se les reconstituyó el volumen con medio enriquecido con inhibidores de proteasas manteniendo la relación de 2 millones de células por ml. Después de esto se separaron las células de acuerdo a los tratamientos requeridos (tabla 7)

Tabla 7. Ensayos para la obtención de citocinas por ELISA

	IgE	IgE/Ag	IgE+LPS	IgE/Ag+LPS	LPS
Lyn ^{+/+}	5 millones	5 millones	5 millones	5 millones	5 millones
Lyn ^{-/-}	5 millones	5 millones	5 millones	5 millones	5 millones

El estímulo fue de 9 ng/ml de DNP-HSA por cada 2 millones de células durante 24 horas, este tiempo fue suficiente para asegurar la presencia de citocinas en el sobrenadante. Transcurridas las 24 horas, las células se centrifugaron a 14 000 rpm a 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante fue guardado para determinar la cantidad de IL-2 ó IL-4 por ELISA, y la pastilla se desechó.

4.9.2 Detección de Interleucina 2 e interleucina 4

Para detectar la presencia de Interleucina 2 (IL-2) e IL-4, se utilizó el paquete de BIOSOURCE International Immunoassay Kit, como sigue: En un tubo de 1.5 ml de tapa plana se agregaron 50 μ l de una solución estándar reconstituída con IL-2 ó IL-4 además de 450 μ l de un amortiguador diluyente estándar. Este tubo fue rotulado con el número 1000 ya que este denota la cantidad de nanogramos por mililitro (ng/ml) de interleucina teóricos en ese tubo. También se rotularon otros siete tubos con los números 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 y 0, los cuales corresponden a la cantidad de ng/ml de interleucina (ya sea IL-2 ó IL-4). A cada uno de ellos se les agregó 300 μ l de un amortiguador diluyente estándar y entonces se hicieron diluciones seriadas y ascendentes tomando 300 μ l a partir del tubo marcado como 1000. Del tubo de 15.6 ya no realizó una dilución más. El tubo marcado con el cero, únicamente contenía los 300 μ l del amortiguador diluyente estándar adicionados inicialmente. Los tubos marcados representan el número teórico de IL-2 e IL-4 en ng/ml que tiene como función servir como referencia (control) para la secreción de interleucina en las células tratadas y estimuladas.

En una placa de ELISA se determinó el número de pozos a utilizar. En cada pozo se adicionaron 50 μ l de las muestras y controles a detectar. Enseguida se adicionó 50 μ l de un anticuerpo anti IL-2 ó anti IL-4 conjugado con biotina a los pozos, excepto en la muestra del tubo marcado con cero. Todos los pozos fueron cubiertos y se incubaron a 37°C durante 120 minutos. Después de este tiempo, los pozos fueron decantados para retirarles el sobrante de la muestra y del anticuerpo acoplado a biotina. Los pozos se lavaron cuatro veces con un amortiguador de lavado para entonces adicionarles 100 μ l de una solución de peroxidasa de rábano acoplada a estreptavidina, se cubrieron los pozos y se incubaron durante 30 minutos a

temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el líquido sobrante se decantó y los pozos se lavaron con el amortiguador de lavado por cuatro veces para adicionarles 100 μ l de cromógeno estabilizado e incubar las muestras durante 30 minutos en la oscuridad absoluta. Cuando transcurrió el tiempo, a cada uno de los pozos se les adicionó 100 μ l de una solución que suspende la reacción dando un color amarillo. Las muestras en amarillo de cada pozo se metieron en un espectrofotómetro para medir la densidad óptica a 450 nm. Con los valores de la curva estándar y los ng de citocina se realizó una curva patrón y una extrapolación de los valores para determinar la cantidad de citocina detectada en las células tratadas.

4.10 PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Las pruebas estadísticas que se utilizaron fueron la prueba de t y ANOVA (Análisis de varianza). Estas pruebas se llevaron a cabo ya que a través de ellas se pueden comparar los datos obtenidos de los dos tipos celulares y sus tratamientos, y saber si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de datos comparados.

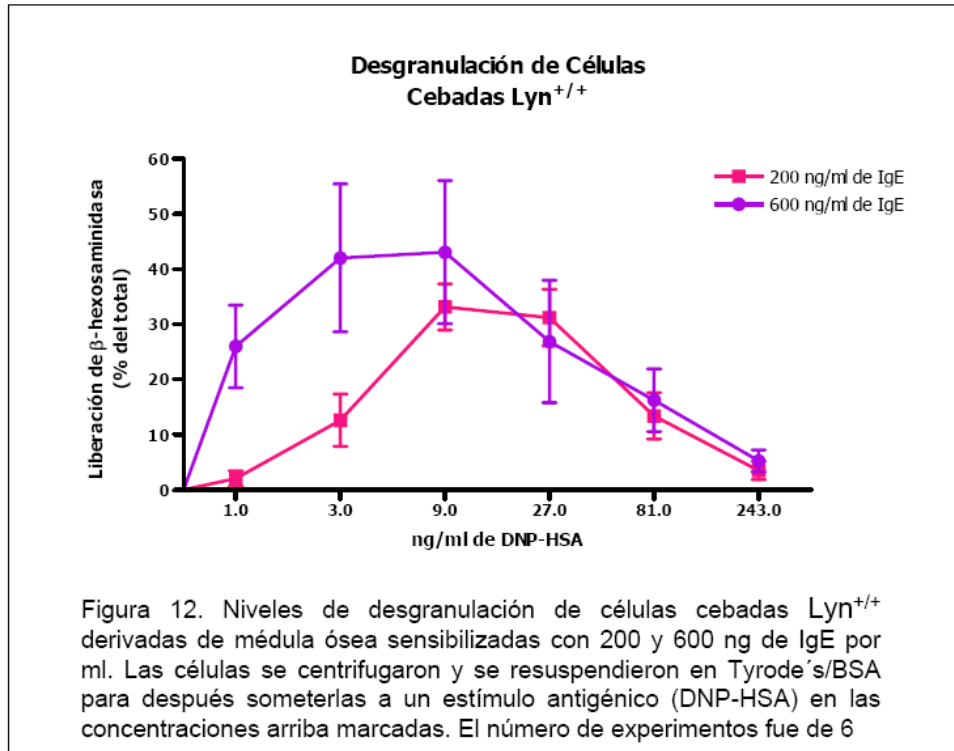
5. RESULTADOS

5.1 Efecto de la IgE en la desgranulación antigénica en células cebadas Lyn^{+/+}

Con el fin de observar la respuesta de las células cebadas ante la estimulación antigénica, se preincubaron células Lyn^{+/+} con 200 ng/ml de IgE. Tal concentración es suficiente para ocupar el 100% de sus receptores en la membrana de las células cebadas (Apéndice 2). Como se observa en la figura 12, las células cebadas de tipo silvestre alcanzaron su máximo de desgranulación cuando se les estimuló con 9 ng/ml de DNP-HSA (33%). A concentraciones pequeñas (1 y 3 ng/ml de DNP-HSA) la liberación del contenido granular fue pequeña, debido a que dichas concentraciones de antígeno no son suficientes para alcanzar el umbral máximo de respuesta. Esto también se observó en las concentraciones más altas de DNP-HSA pero la explicación en este caso es que las concentraciones elevadas de antígeno evitan la formación de agregados de IgE, lo que disminuye la liberación del contenido granular.

Para ver cual era el efecto de la sensibilización con IgE en la estimulación antigénica de las células cebadas tipo silvestre, se utilizó una segunda concentración de IgE la cual fue de 600 ng/ml. Dicha concentración también satura al receptor, lo que hace que no solo haya 100% de ocupación, si no que se formen agregados de manera espontánea, ya sea por la agregación de IgE en la solución o por la dimerización espontánea del receptor en la membrana. Como se observa en la figura 12, la curva concentración respuesta a cantidades pequeñas de antígeno, muestra una clara diferencia en los niveles de desgranulación. En el primer estímulo (1 ng/ml de DNP-HSA), la liberación del contenido granular mejoró en un 20% aproximadamente respecto a la primera concentración de IgE utilizada. Este hecho fue aún más evidente en la concentración de 3 ng/ml de DNP-HSA, donde la diferencia en la desgranulación fue del 30%. Sin embargo, esta diferencia no se observó en la concentración óptima (9

ng/ml de DNP-HSA) ya que la diferencia en la liberación de los gránulos fue pequeña y no mostró niveles significativamente distintos entre las células tratadas con las dos concentraciones de IgE.

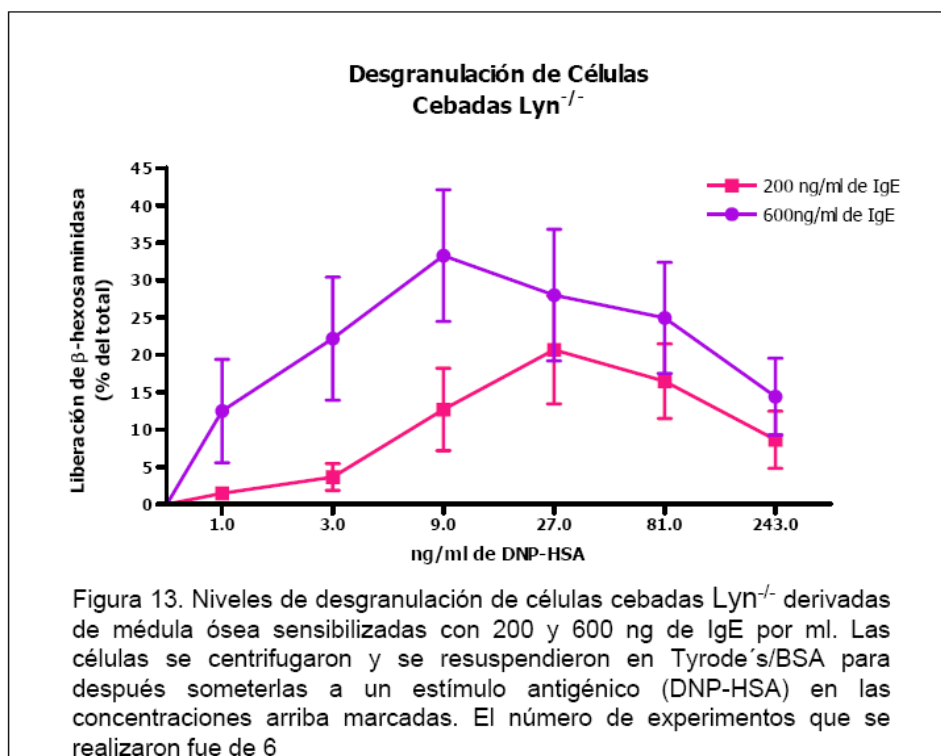


5.2 Efecto de la IgE en la desgranulación antigénica en células cebadas $Lyn^{-/-}$

Para saber si la ausencia de la cinasa Lyn causaba un defecto en la liberación del contenido granular ante la estimulación antigénica, se sensibilizaron células carentes de la cinasa Lyn con 200 ng/ml de IgE. Como se observa en la figura 13, la liberación del contenido granular se incrementa a medida que las concentraciones de antígeno son mayores alcanzando su máximo de desgranulación a la concentración de 27 ng/ml de DNP-HSA (20%). A partir de esta concentración de antígeno, la liberación del contenido granular decayó a cantidades grandes de DNP-HSA.

Para observar el efecto de la IgE sobre la activación antigénica de las células cebadas carentes de la cinasa Lyn, se sensibilizaron células $Lyn^{-/-}$ con una mayor concentración de IgE (600 ng/ml). Los datos obtenidos en la figura 13 muestran que

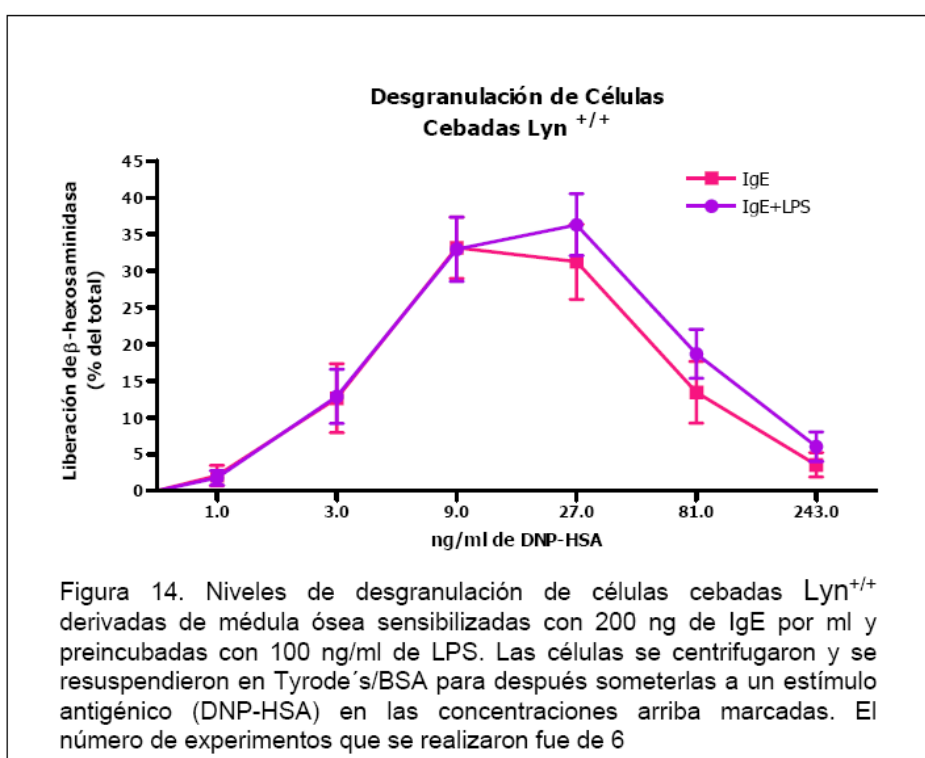
los niveles de desgranulación mejoraron en toda la curva concentración respuesta respecto a los obtenidos con la concentración de 200 ng/ml de IgE. Esta mejoría fue más clara a concentraciones de 3 y 9 ng/ml de DNP-HSA, donde la diferencia fue aproximadamente de 11, 18 y 21%, respectivamente. Una vez que las células alcanzaron el máximo de desgranulación a los 9 ng/ml de DNP-HSA, los niveles de liberación granular decayeron conforme la concentración de antígeno fue en aumento (27, 81 y 243 ng/ml de DNP-HSA).



5.3 Efecto de la preincubación con LPS sobre las células cebadas sensibilizadas con una concentración suficiente de IgE

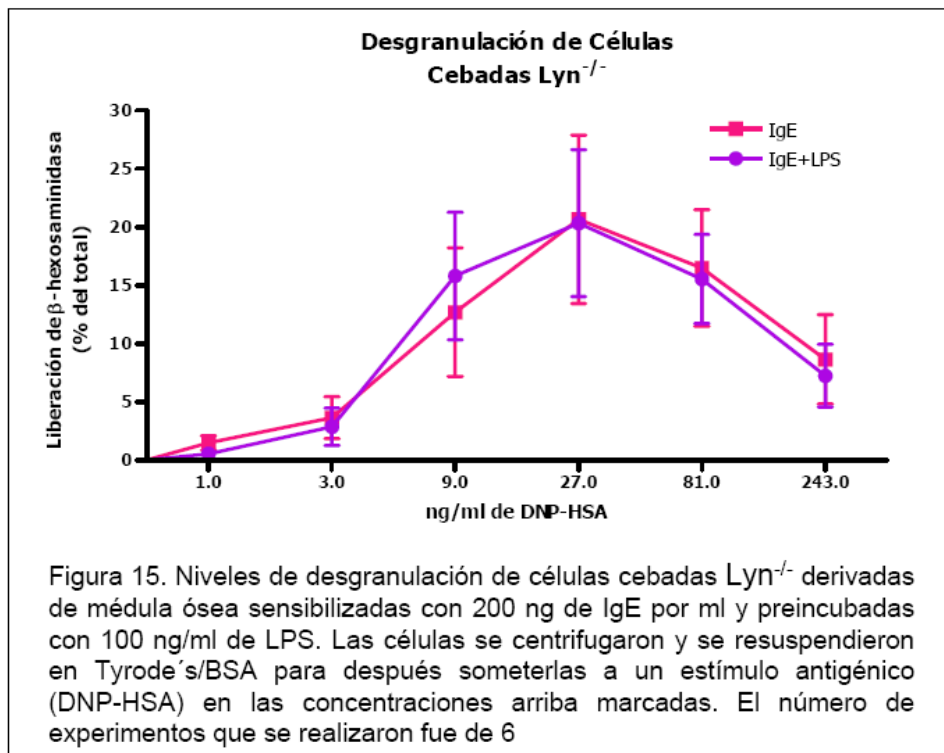
Para analizar si la preincubación con LPS modifica la capacidad para desgranular, se trataron células cebadas de tipo silvestre con IgE (200 ng/ml) y con IgE + LPS (100

ng/ml) durante 18 horas. Como se muestra en la figura 14, los niveles de liberación granular de las células cebadas sensibilizadas con IgE alcanzaron niveles óptimos de desgranulación entre las concentraciones de 9 y 27 ng/ml de DNP-HSA decayendo a concentraciones mayores de antígeno. Los niveles de desgranulación cuando a las células se les preincubó con LPS, no cambiaron significativamente, es decir, que el LPS no tuvo la capacidad de modificar la cantidad de liberación de β -hexosaminidasa contenida en los gránulos por parte de las células cebadas estimuladas antigénicamente.



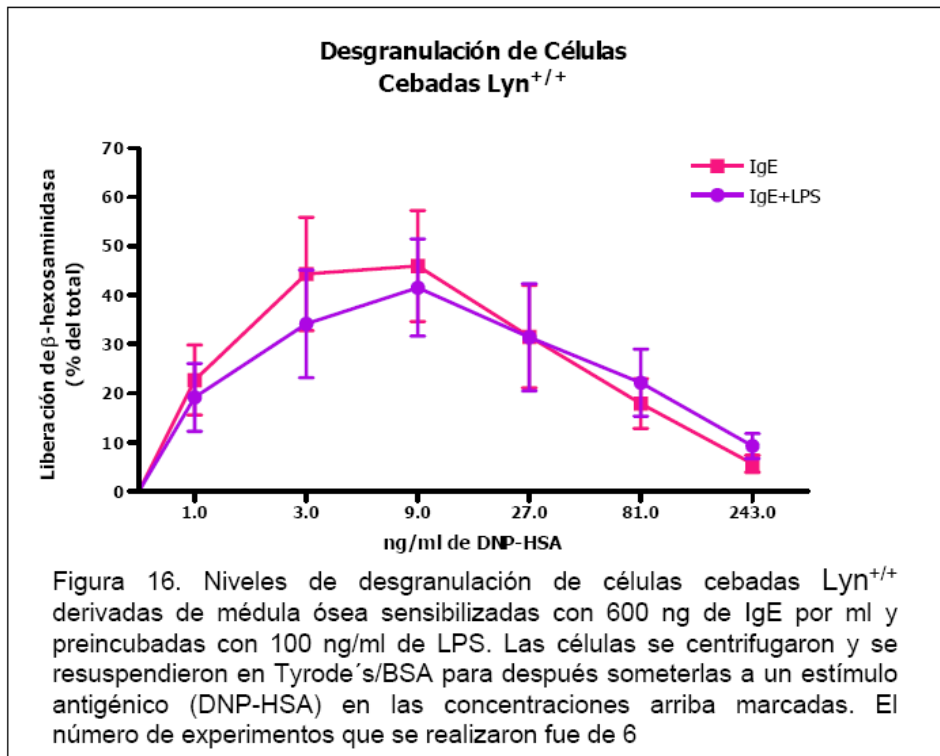
Para saber si las células carentes de la cinasa Lyn mostraban una modificación adicional en la desgranulación ante una preincubación con LPS, se trataron células Lyn^{-/-} con IgE (200 ng/ml) y con IgE + LPS (100 ng/ml) durante 18 horas. En la figura 15 se muestra que cuando a las células se les trató con IgE, los niveles de desgranulación fueron menores que los observados en las células tipo silvestre a concentraciones bajas de antígeno (figura 14) y la liberación máxima se detectó a los 27 ng/ml de antígeno (DNP-HSA). La desgranulación de las células carentes de la

cinasa Lyn como ya se había observado (figuras 12 y 13) fue menor y la preincubación con LPS no modificó las cantidades de los contenidos granulares liberadas.



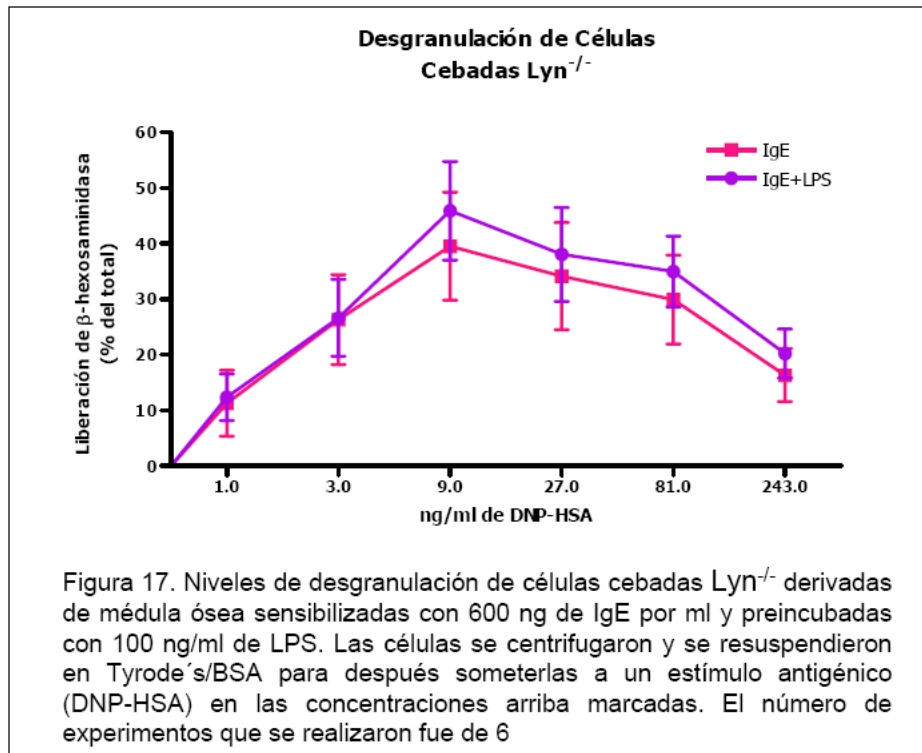
5.4 Efecto de la preincubación con LPS sobre las células cebadas sensibilizadas con una concentración saturante de IgE.

Para averiguar si la preincubación con LPS modifica los niveles de desgranulación de las células cebadas sensibilizadas con una concentración alta de IgE, se trataron células $Lyn^{+/+}$ con IgE (600 ng/ml) y con IgE + LPS (100 ng/ml) durante 18 horas. Como se observa en la figura 16, las células silvestres sensibilizadas mostraron una liberación del contenido granular máxima del 46% con 9 ng/ml de DNP-HSA disminuyendo la desgranulación a cantidades más altas de antígeno. Cuando a las células además de tratarlas con IgE, se preincubaron con LPS, los niveles de desgranulación fueron similares por lo que el LPS careció de influencia alguna sobre la liberación granular.



Para analizar si la ausencia de la cinasa Lyn tenía consecuencias sobre la desgranulación de las células cebadas sensibilizadas con una concentración alta de IgE preincubadas con LPS, se trataron células $Lyn^{-/-}$ con IgE (600 ng/ml) y con IgE + LPS (100 ng/ml) durante 18 horas. Como se observa en la figura 17, la liberación del contenido granular de las células cebadas sensibilizadas con IgE no fue estadísticamente diferente de aquellas células que además de ser sensibilizadas fueron preincubadas con LPS. En ambos tratamientos, la desgranulación alcanzó su máximo a los 9ng/ml de antígeno.

Todos los datos obtenidos de los tratamiento donde se preincubaron a las células con LPS fueron similares de los datos obtenidos con las células únicamente sensibilizadas. Esto quiere decir que la preincubación con LPS no modifica la fase temprana de activación inducida por las células cebadas ante un estímulo del receptor $Fc\epsilon RI$, es decir, que el LPS no altera la capacidad de desgranular de dichas células.



5.5 Inducción del RNAm de IL-2 en células cebadas $Lyn^{+/+}$ activadas antigénicamente.

Para conocer el efecto de la respuesta al antígeno mediada por IgE sobre la síntesis de citocinas, se realizaron ensayos de RT-PCR para detectar el RNA mensajero (mRNA) para la interleucina 2 (IL-2) en células cebadas de tipo silvestre. Las células fueron sensibilizadas con IgE (600 ng/ml) durante 18 horas. La figura 18 muestra que las células de tipo silvestre indujeron (25.5 veces) la síntesis del RNA mensajero de la IL-2 solo cuando hubo estímulo antigénico (carril 2), ya que cuando éstas no fueron sometidas a un estímulo por DNP-HSA (carril 1), la presencia del transcrito para IL-2 no se detectó. Estos datos indican que la sola presencia de IgE no induce la síntesis del mensajero y que, en presencia de antígeno, el $Fc\epsilon RI$ puede hacer que la señal pase del exterior de la célula al núcleo de la misma, induciendo la expresión del gen de IL-2.

5.6 Efecto de la preincubación con LPS sobre la síntesis del RNAm de IL-2 en células cebadas Lyn^{+/+} activadas antigénicamente.

Para saber si la preincubación con LPS tenía alguna influencia sobre la síntesis de IL-2 inducida por IgE y antígeno en las células cebadas Lyn^{+/+}, se trataron células con IgE (600 ng/ml), LPS (100 ng/ml) e IgE + LPS durante 18 horas. Los datos obtenidos en la figura 18 muestran que el RNAm de IL-2 en las células cebadas silvestres es inducido (16.3 veces) en presencia de antígeno (carril 4) ya que en ausencia de éste (carril 3), no se observa la presencia del mensajero. Otro dato obtenido fue que en las células Lyn^{+/+}, la preincubación con LPS no indujo la síntesis de IL-2 (carril 5). Como se observa en la figura 18, el pretratamiento con LPS de las células silvestres activadas no tuvo un efecto claro sobre la síntesis del transcrito de IL-2 inducido antigénicamente (carriles 2 y 4).

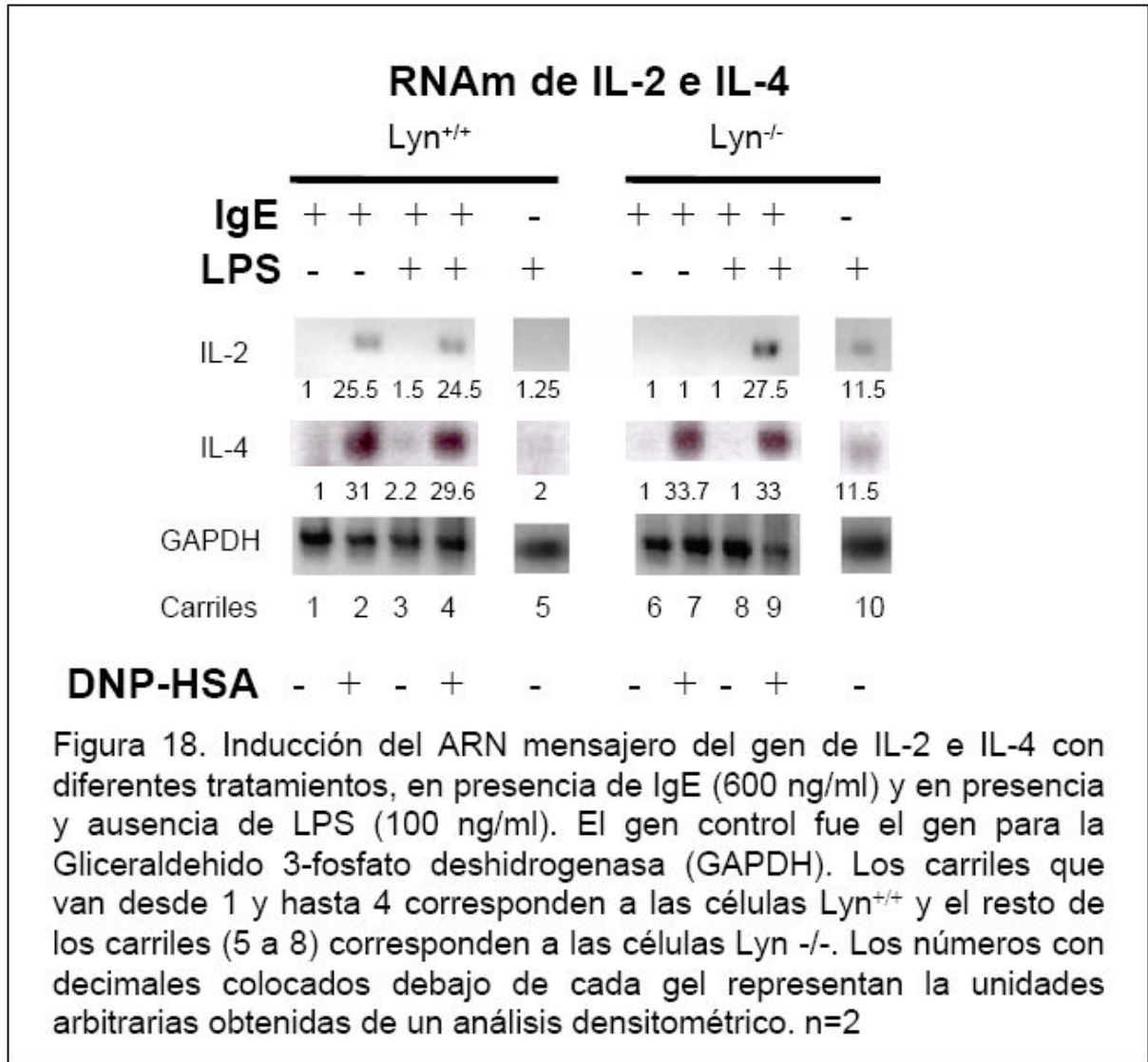
5.7 Inducción del RNAm de IL-2 en células cebadas Lyn^{-/-} activadas antigénicamente.

Para observar si la ausencia de Lyn tenía consecuencias en la síntesis de IL-2, se preincubaron células Lyn^{-/-} con IgE (600 ng/ml) durante 18 horas. En la figura 18, se observa que las células sin la cinasa Lyn preincubadas con IgE no mostraron la inducción de IL-2 (carril 6) al igual que cuando se les estimuló con antígeno (carril 7), es decir, que las células sin Lyn estimuladas antigénicamente, tienen un claro defecto en la síntesis de IL-2 mediada por el receptor FcεRI, por lo que la vía que lleva a la inducción de IL-2 mediada por la estimulación antigénica, requiere de la cinasa Lyn para inducir la síntesis del transcrito.

5.8 Efecto de la preincubación con LPS sobre la síntesis del RNAm de IL-2 en células cebadas $Lyn^{-/-}$ activadas antigénicamente.

Para observar el efecto que la preincubación con LPS tiene sobre las células cebadas deficientes de Lyn, se trataron células $Lyn^{-/-}$ en presencia de IgE (600 ng/ml), LPS (100 ng/ml) e IgE + LPS. En la figura 18 se observa que las células $Lyn^{-/-}$ que fueron tratadas con IgE en ausencia de estímulo, no indujeron la síntesis del mensajero de IL-2 (carril 8). De manera contraria, cuando a las células se les preincubó con LPS y se les aplicó un estímulo antigénico (carril 9), las síntesis de IL-2 fue claramente inducida (27.5 veces). Estos datos sugieren que la presencia de LPS puede activar una vía alterna encaminada a la síntesis de IL-2 independiente de Lyn. En la preincubación de las células $Lyn^{-/-}$ con LPS se observa que el LPS (carril 10) puede inducir la síntesis del RNAm de IL-2 en este tipo celular, un dato interesante ya que en las células silvestres la preincubación con LPS no indujo la síntesis de este mensajero (carril 5) sugiriendo que la cinasa Lyn podría ser un elemento de control negativo sobre la vía del TLR-4 que lleva a la síntesis del transcrito de IL-2. Otro dato interesante que contrasta con el dato del carril 10 es que en las células $Lyn^{-/-}$ tratadas con IgE + LPS no se detectó el RNAm de IL-2 (carril 8). Estos datos sugieren que la sensibilización con IgE hace que la preincubación con LPS no pueda inducir la síntesis de IL-2 en células cebadas $Lyn^{-/-}$.

La densitometría nos sirvió para analizar detalladamente los efectos que la preincubación con LPS tubo en las células silvestres activadas antigénicamente, por lo que se pudo observar que las células sin Lyn estimuladas en presencia de LPS (carril 9), no mostraron niveles mayores de transcrito de IL-2 respecto a las células $Lyn^{+/+}$ sometidas al mismo tratamiento (carril 4).



5.9 Inducción del RNAm de IL-4 en células cebadas Lyn^{+/+} sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.

Para averiguar el efecto de la estimulación antigénica sobre la síntesis de interleucina 4 (IL-4), se trataron células cebadas Lyn^{+/+} en presencia de IgE (600 ng/ml), LPS (100 ng/ml) e IgE + LPS durante 18 horas. Como se muestra en la figura 18, la activación antigénica de las células cebadas indujo (31 veces) la síntesis del RNA mensajero de IL-4 (carril 1) en cantidades más abundantes que el transcrito de IL-2. Cuando evaluamos la influencia del LPS durante la preincubación, se observó que conjuntamente con la IgE pueden inducir (2.2 veces) una pequeña cantidad del RNAm

de IL-4 (carril 3), algo que no fue observado en las células tratadas sólo con IgE (carril 1). Las células tratadas con LPS e IgE estimuladas antigénicamente, mostraron una clara inducción del transcrito de IL-4 (carril 4). En el análisis densitométrico se observa que la preincubación con LPS no modificó claramente la inducción del RNAm de IL-4 mediada por antígeno.

5.10 Inducción del RNAm de IL-4 en Células Cebadas $Lyn^{-/-}$ sensibilizadas con IgE y preincubadas con y sin LPS

Para evaluar el papel de Lyn en la síntesis del mensajero de IL-4 inducida por antígeno y la influencia que el LPS ejerce sobre ésta, se trataron células carentes de la cinasa Lyn con IgE (600 ng/ml), LPS (100 ng/ml) e IgE + LPS durante 18 horas. La figura 18 muestra que la estimulación antigénica de las células $Lyn^{-/-}$ indujo (33.7 veces) la síntesis del RNAm de IL-4 (carril 7) respecto a las células que no fueron estimuladas (carril 6). Cuando a las células se les trató con LPS se vio que los niveles de RNAm de IL-4 no cambiaron respecto a las células activadas en ausencia de LPS, por lo que la activación del TLR-4 careció de algún efecto sobre la inducción de IL-4 mediada por antígeno (carril 9). Sin embargo, el LPS indujo (11.5 veces) la síntesis del transcrito de IL-4 en las células cebadas $Lyn^{-/-}$ (carril 10) en niveles por debajo de las células activadas con antígeno (33.7 y 33 veces), pero por encima de las células que fueron tratadas con IgE (carril 6) o con IgE más LPS (carril 8)

5.11 Secreción de IL-2 en células cebadas $Lyn^{+/+}$ sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS

Para saber si los efectos observados sobre el RNAm para IL-2 repercutían en la secreción de esta citocina, se sensibilizaron células silvestres con IgE (600 ng/ml) durante 18 horas antes de estimularlas con antígeno durante 24 horas. Los datos

preliminares de la figura 19 muestran que sólo el estímulo antigénico indujo (~2, 300 pg/1x10⁶ células) la secreción de IL-2 en células silvestres. En contraposición, la IgE por si sola no indujo la secreción de IL-2 en las mismas células, estos datos están en acuerdo con los de la figura 18, donde tampoco se observó el RNAm para IL-2.

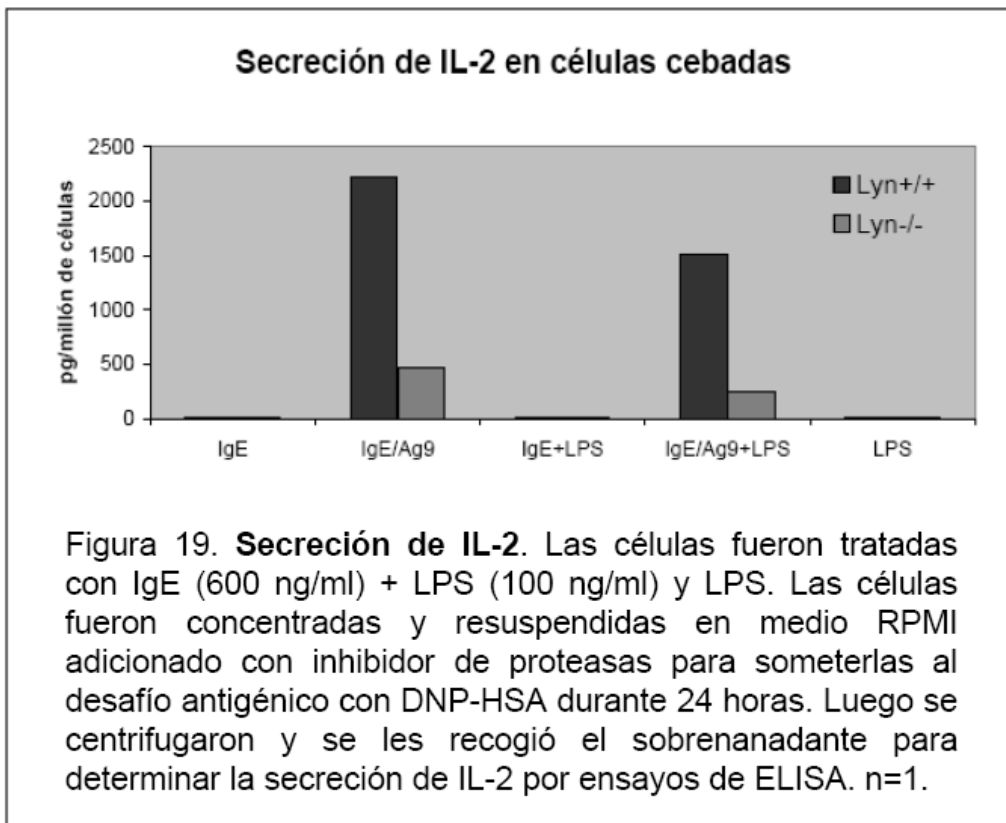
Para conocer si la preincubación con LPS modificaba la respuesta de las células cebadas en términos de la secreción de IL-2, se trataron células Lyn^{+/+} en presencia de IgE + LPS (100ng/ml) y solo con LPS durante 18 horas antes de una estimulación antigénica por 24 horas. Los datos preliminares de la figura 19 muestran que la preincubación con LPS pudo disminuir la secreción de IL-2 inducida por la activación antigénica mediada por el receptor FcεRI (~1, 500 pg/1x10⁶ células). Un control adicional mostró que la preincubación con LPS no indujo la síntesis de IL-2. Estos datos indican que la activación del TLR-4 puede desensibilizar la secreción de IL-2 mediada por IgE-antígeno.

5.12 Secreción de IL-2 en células cebadas Lyn^{-/-} sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.

Para observar el papel de la cinasa Lyn en la secreción de IL-2 inducida antigénicamente, se sensibilizaron células Lyn^{-/-} con IgE (600 ng/ml) durante 18 horas antes de la estimulación prolongada con antígeno. Datos preliminares de la figura 19 muestran que las células sin Lyn pudieron secretar IL-2 en respuesta a la estimulación antigénica (~500 pg/1x10⁶ células). Al comparar este dato con el obtenido de las células Lyn^{+/+} tratadas con IgE/antígeno, se observa una clara disminución de la cantidad de citocina secretada, sugiriendo que la cinasa Lyn puede optimizar la secreción de IL-2 en células cebadas.

Para ver cual era el efecto de la preincubación con LPS sobre la secreción de IL-2 en las células cebadas sin la cinasa Lyn activadas antigénicamente, se trataron células Lyn^{-/-} con IgE + LPS (100ng/ml) y solo con LPS. Los datos preliminares de la figura 19 muestran que la preincubación con LPS pudo desensibilizar la secreción de IL-2 inducida por antígeno. Nótese que los niveles de secreción fueron de alrededor de 250 pg/millón de células, aproximadamente 5 veces menos que las células Lyn^{+/+} sometidas al mismo tratamiento. La preincubación con LPS no ocasionó que las células cebadas Lyn^{-/-} secretaran IL-2.

Conjuntamente, los datos preliminares mostrados indican que la cinasa Lyn puede funcionar como una proteína efectora positiva en la secreción de IL-2, ya que su ausencia provoca que los niveles de IL-2 liberados sean menores. Asimismo, la presencia de LPS en ambos tipos celulares tuvo la propiedad de disminuir la cantidad de IL-2 secretada en respuesta a la estimulación mediada por el receptor FcεRI en células cebadas.



5.13 Secreción de IL-4 en Células Cebadas Lyn^{+/+} sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.

Para observar la secreción de IL-4 en células cebadas se sensibilizaron células Lyn^{+/+} en presencia de IgE (600 ng/ml) durante 18 horas antes de la estimulación con antígeno por 24 horas. Los datos preliminares obtenidos en la figura 20 muestran que las células tipo silvestre secretaron IL-4 en presencia de antígeno (~350 pg/1x10⁶ células) y no así en su ausencia. Al comparar este caso con el de la figura 19, se observa que los niveles de IL-4 secretada disminuyeron considerablemente respecto a los niveles de IL-2, por lo que la secreción de estas citocinas puede acoplarse de manera diferencial a la activación del FcεRI.

Para conocer la influencia de la preincubación con LPS sobre las células cebadas Lyn^{+/+} activadas, se trataron células tipo silvestre con IgE + LPS (100 ng/ml) y solo con LPS durante 18 horas. Los datos preliminares presentados en la figura 20 muestran

que la estimulación antigénica de las células $Lyn^{+/+}$ pudo inducir la secreción en nuestro sistema (~ 200 pg/ 1×10^6 células). Esta secreción, fue ligeramente más pequeña que la alcanzada por las células sin tratamiento con LPS. Sin embargo, las cantidades de IL-4 detectadas, se colocaron por debajo de los niveles alcanzados de IL-2 ante el mismo tratamiento. Estos datos indican que en las células cebadas $Lyn^{+/+}$, la secreción de IL-4 es inducida solo por antígeno y que la presencia del LPS puede desensibilizar la secreción dada por un desafío antigénico.

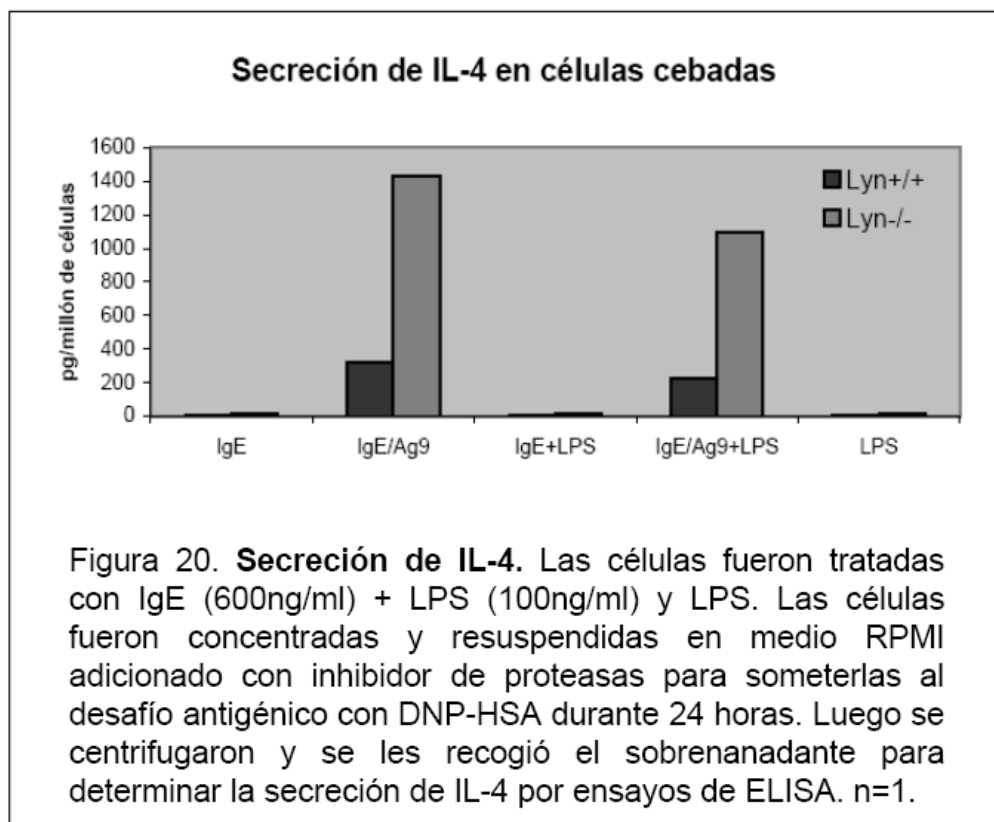
5.14 Secreción de IL-4 en células cebadas $Lyn^{-/-}$ sensibilizadas con IgE y preincubadas con o sin LPS.

Para evaluar el papel de Lyn en la secreción de IL-4 de células cebadas, se sensibilizaron células $Lyn^{-/-}$ en presencia de IgE (600 ng/ml) durante 18 horas antes de una estimulación prolongada con antígeno. Como se muestra de forma preliminar en la figura 20, la presencia de antígeno culminó en una secreción abundante de IL-4 respecto a las células $Lyn^{+/+}$ ($\sim 1,450$ pg/ 1×10^6 células). Con este dato se puede decir que la cinasa Lyn puede regular negativamente la secreción de IL-4 mediada por antígeno ya que en su ausencia la secreción se disparó.

Para averiguar la influencia de la preincubación con LPS sobre las células cebadas carentes de la cinasa Lyn activadas mediante antígeno, se trataron células $Lyn^{-/-}$ con IgE, LPS (100 ng/ml) e IgE + LPS, durante 18 horas. Como se puede observar en la figura 20 de manera preliminar, las células $Lyn^{-/-}$ secretaron IL-4 en presencia de antígeno y el pretratamiento con LPS desensibilizó la secreción de IL-4 ($\sim 1,100$ pg/ 1×10^6 células). No obstante, al comparar estos datos con los obtenidos en la figura 19, se observa que la secreción de IL-4 mejoró respecto a la de IL-2, en el mismo tipo celular y bajo las mismas condiciones experimentales, por lo que se sigue observando

el papel de Lyn como un elemento que puede regular negativamente la secreción de IL-4.

Como se ha visto, la activación de las células cebadas mediada por antígeno puede llevar a la secreción de citocinas. De manera diferente a lo que sucedió con la secreción de IL-2 (Figura 19), la cinasa Lyn puede acoplarse de manera negativa a la liberación de IL-4 al medio extracelular (figuras 20), por lo que aquí se muestra un claro ejemplo del papel diferencial que ejerce la cinasa Lyn sobre la secreción de citocinas como IL-2 o IL-4. Por otra parte, la influencia del LPS fue la misma ya que su presencia siempre desensibilizó la secreción de IL-2 e IL-4 mediada por antígeno.



6. DISCUSIÓN

Las células cebadas constituyen un tipo celular muy importante en el sistema inmune ya que pueden participar en la respuesta del hospedero frente a estímulos que activan a la inmunidad innata, además de estar involucradas en las reacciones alérgicas. La unión de la IgE a su receptor ($Fc\epsilon RI$) puede influenciar en gran medida el umbral de activación de las células cebadas. Ejemplo de ello fueron las células silvestres (figura 12) sensibilizadas con una concentración de IgE (200ng/ml) suficiente para ocupar todos sus receptores en la membrana, y cuyos niveles de desgranulación alcanzaron una liberación máxima a los 9 ng/ml de antígeno (DNP-HSA). Sin embargo, cuando se les trató con una concentración más alta de IgE (600ng/ml), el umbral de respuesta alcanzó su máximo desde la concentración de 3 ng/ml de antígeno y se mantuvo hasta los 9 ng/ml. La segunda concentración de IgE (600ng/ml) que fue utilizada mimetiza el estado atópico (altas concentraciones de IgE en sangre) de las personas asmáticas.

A medida que las cantidades de DNP-HSA fueron creciendo la respuesta decayó debido a que las grandes cantidades de antígeno hacen que la IgE se mantenga en forma de monómero evitando la agregación y disminuyendo la respuesta de las células cebadas. Las dos curvas concentración respuesta muestran que los puntos máximos de liberación del contenido granular se alcanzaron a una concentración de antígeno baja (9 ng/ml) que aglutina a una pequeña fracción de los receptores disponibles en la membrana pero donde se encuentra la respuesta óptima. La explicación a este fenómeno es que del total de los receptores $Fc\epsilon RI$ ($4-10 \times 10^4$) que se tienen en la membrana de cada célula cebada derivada de médula ósea, solo es necesario el 10% aproximadamente de ellos para alcanzar una respuesta comprendida entre el 40 y el 60% de la liberación granular total (31). Por otra parte, los datos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que se requiere de un mínimo de

ocupación del 30% del total de los receptores para alcanzar la respuesta máxima (datos no publicados).

El sistema de transducción del receptor FcεRI comprende una serie de moléculas que conducen a la activación de la respuesta antigénica. Un elemento que participa activamente es Lyn, cuya función es la de fosforilar residuos de tirosinas de secuencias altamente conservadas llamadas ITAMs (de las cadenas βγ del FcεRI) y de proteínas adaptadoras como LAT en las células cebadas (7). El papel de Lyn ha sido previamente descrito como el de ser una cinasa que regula negativamente el sistema señalizador que lleva a la desgranulación, por lo que, en su ausencia, existe una hipersensibilidad por parte de las células cebadas en la estimulación antigénica (15). No obstante, en la figura 13 se observó que las células carentes de la cinasa Lyn tratadas con 200ng/ml de IgE, no alcanzaron valores más altos de desgranulación en comparación con los datos obtenidos en las células silvestres (figura 12).

Con el fin de observar la hipersensibilidad reportada para las células Lyn^{-/-} se incrementó la concentración de IgE (600ng/ml) y se vio que los niveles de desgranulación fueron más altos respecto a los de las células tratadas con la primera concentración de IgE (200ng/ml) (figura 13). Sin embargo, la desgranulación no fue estadísticamente diferente de la obtenida en las células silvestres (figura 12).

Hasta este punto es claro que las concentraciones de IgE pueden determinar la capacidad de respuesta de las células cebadas. Esto se debe a que entre mayor es la concentración de IgE en un volumen dado es menos difícil mantener sin ocupación a un receptor ya que en cuanto una IgE se separa de éste, otra IgE se une enseguida, manteniendo al receptor constantemente sensible para responder al antígeno. Otro motivo por el que a mayor concentración de IgE hay mayor umbral de respuesta, es por que la probabilidad de la interacción IgE-IgE en solución es mayor. Esto hace que

se incremente la formación de multímeros de IgE, los cuales al unirse a sus receptores, promueven el incremento en la respuesta temprana de las células cebadas (31). De esta manera, el umbral de respuesta de dichas células puede estar en función de la concentración de IgE unida a su receptor, lo que promueve la generación espontánea de dímeros en la membrana influenciando la respuesta antigénica (32). También es evidente que Lyn puede modificar los niveles de desgranulación de las células cebadas. Sin embargo, el papel que juega esta cinasa en el sistema de transducción del FcεRI es controversial ya que puede funcionar como un regulador positivo o negativo en la cascada de señalización (33).

Las vías de señalización del FcεRI y del TLR-4 están presumiblemente relacionadas aunque no en todos los parámetros de activación por parte de las células cebadas. En el presente trabajo se evaluó la respuesta antigénica después de una preincubación prolongada con LPS y se vio que éste no modificó la capacidad de respuesta de las células cebadas cuando fueron sensibilizadas a cualquier concentración de IgE (figuras 14, 15, 16 y 17). Estos datos sugieren que las vías que llevan a la liberación del contenido granular por parte de la activación del FcεRI parecen no compartir ningún elemento con la vía del TLR-4, es decir, que la preincubación con LPS no modifica la fase temprana de activación ejercida por las células cebadas en respuesta a la estimulación antigénica.

La fase tardía de las respuestas de las células cebadas se inicia con la activación de una compleja maquinaria transcripcional, y por ello, además de observar el parámetro dado por la desgranulación antigénica, se puede observar el parámetro dado por la síntesis *de novo* de diversos transcritos de genes de citocinas.

En este trabajo se detectó al transcrito de la IL-2 (figura 18) y los datos mostraron que las células silvestres indujeron el mensajero en presencia de antígeno. Cuando se evaluó el papel de la preincubación con LPS en las células silvestres, no se observó un cambio significativo en la estimulación antigénica y tampoco con la sola preincubación con LPS. Un dato interesante fue que las células carentes de la cinasa Lyn no indujeron la síntesis del mensajero de IL-2 al estimularlas antigénicamente, por lo que la síntesis del RNAm de IL-2 requiere de la cinasa Lyn. No obstante, cuando a las células carentes de Lyn, se les preincubó con LPS, se indujo la síntesis de este mensajero en ausencia o presencia de IgE-antígeno, por lo que el LPS activa una vía independiente de la cinasa Lyn encaminada a la expresión del gen de IL-2. Tal activación que puede verse incrementada ante la estimulación antigénica.

Con éstos datos, existe evidencia de que la vía de señalización que lleva a la expresión del gen de IL-2 inducida por LPS, puede ser regulada negativamente por la cinasa Lyn, sin embargo se desconoce si esta cinasa interactúa directamente con alguna molécula de la vía del TLR-4 o con un complejo señalizador que reprime la expresión del gen de IL-2 inducida por el TLR-4.

En la literatura, hay reportes donde se mide la actividad de diversos factores de transcripción a través de su unión a las regiones denominadas elementos *cis* en el promotor del gen que codifica para IL-2 en células cebadas. En tales casos se ha determinado que el factor de transcripción AP-1, cuya composición comprende las proteínas Jun y Fos, se activa río debajo de la fosforilación de la proteína cinasa activada por mitógeno JNK. Así, AP-1 puede formar complejos con el factor de transcripción OctP (34). Por otra parte, el factor nuclear activado por células T (NF-AT), también participa activamente en la regulación de la transcripción del gen de IL-2. NF-AT puede interactuar con AP-1 a través de la isoforma NF-ATd, no obstante, los dímeros compuestos por NF-ATd-NF-ATc también son importantes para regulación de

la expresión del gen de IL-2. En estos casos, la actividad de dichos factores de transcripción está enunciada como dependiente de la proteína BTK, cuya localización se encuentra próxima al receptor FcεRI (34).

La activación de los miembros de la familia NF-AT en las células del sistema inmune requiere de la movilización de calcio para que éste se una a la proteína denominada calmodulina, la cual activa a una fosfatasa llamada calcineurina que desfosforila a NF-AT induciendo su actividad sobre las regiones promotoras de varios genes de citocinas, entre ellos el de IL-2 (35). Otros factores de transcripción están involucrados en la expresión del gen de IL-2, como ATF2, Elk-1, CD28RC y NF-κB, donde este último está compuesto por diferentes subunidades de la familia Rel y cuya combinación determina la activación o represión de la expresión del gen de IL-2 (34). Ejemplo de ello es el dímero de NF-κB compuesto por las subunidades p50-p65 que inducen la expresión del transcrito de IL-2 y su contraparte, el dímero de NF-κB compuesto por las subunidades p50-p50 que inhibe la transcripción del gen de IL-2 (34). Experimentos en células T muestran la participación de otro grupo de factores de transcripción llamados proteínas de respuesta al crecimiento temprano (EGR), los cuales incluyen a EGR-1 y 4, mismos que pueden formar heterodímeros con las isoformas d y c de NF-AT e integrarse al complejo transcripcional de la región promotora de IL-2 (36). Por otra parte, un elemento que funciona como regulador negativo que también es un factor nuclear, denominado p21SNFT, puede inhibir la actividad de NF-AT (35).

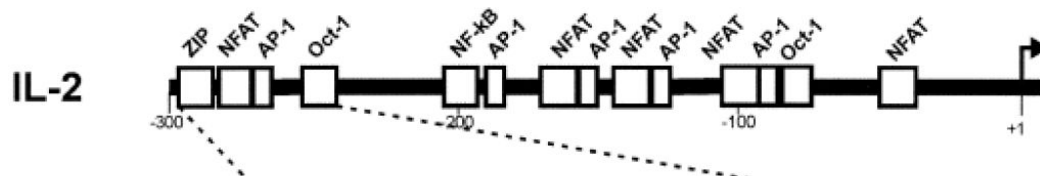


Figura 21. **Región promotora del gen de IL-2.** Los sitios reguladores individuales corresponden a las proteínas de unión indicadas en cada segmento. Los números representan las posiciones relativas al sitio de inicio de la transcripción (+1). Figura tomada de Decker et al. *Nucleic Acid Research* 31:911-921 (2003)

La expresión del gen de IL-2 requiere entonces una variedad de factores nucleares que participan en su transcripción y la activación de éstos puede provenir de la actividad río arriba de proteínas señalizadoras activadas por diferentes ligandos. Se sabe que el TLR4 activa al factor de transcripción NF- κ B y que el Fc ϵ RI también puede hacerlo. De esta manera, es que se puede explicar en parte por qué el LPS puede inducir la expresión del transcrito de IL-2 en células Lyn^{-/-}, lo cual estaría en relación de la combinación de factores nucleares activados por las células cebadas previo tratamiento con LPS e IgE y lo que llevaría a la indicación de que existen moléculas o complejos moleculares que se comparten en ambas vías (Fc ϵ RI y TLR-4). Sin embargo, esto es algo que aún no se encuentra entre la literatura, por lo que investigaciones posteriores se necesitarán para llegar a establecer la relación entre el receptor Fc ϵ RI y el TLR-4.

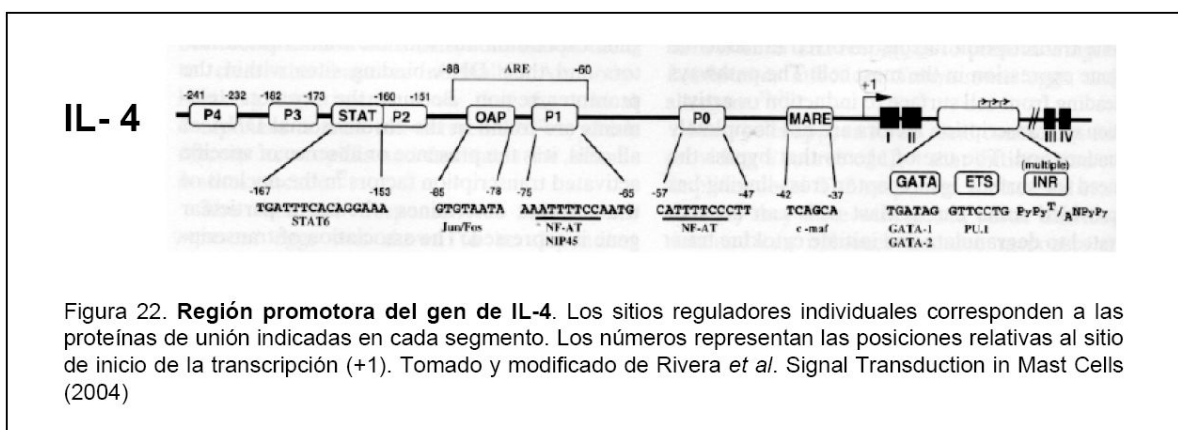
Un segundo transcrito que se midió en este trabajo fue el de la IL-4 y se vio que las células cebadas activadas antigénicamente indujeron la síntesis del transcrito de IL-4 (figura 18). Cuando se determinó la influencia del LPS se observó que la inducción del gen de IL-4 se da en presencia de IgE mas LPS, aumentando la actividad transcripcional en presencia de antígeno.

Al evaluar la respuesta en las células sin Lyn en la inducción del mensajero de IL-4, los resultados mostraron que la IgE puede inducir la síntesis del transcrito de forma discreta. Al estimular antigénicamente a las células carentes de Lyn, los niveles del RNAm de IL-4 aumentaron claramente, por lo que la ausencia de la cinasa Lyn no eliminó la síntesis del transcrito de IL-4. Cuando observamos la influencia del LPS en las células activadas se observó que el LPS no indujo ningún efecto en las células Lyn^{-/-} estimuladas antigénicamente, pero si indujo la expresión del gen cuando a las células se les trató únicamente con LPS. Con estos datos se puede decir que el LPS no modifica la síntesis del mensajero de IL-4 en células Lyn^{-/-} activadas por antígeno, pero en ausencia de este último, el LPS parece sensibilizar al sistema por lo que lleva a la expresión del gen de IL-4, un hecho que no se observó en presencia de IgE.

En general se observó que no hubo variaciones importantes sobre la síntesis del transcrito de IL-4 en células cebadas tipo silvestre respecto a las carentes de Lyn. Es decir, que la cinasa Lyn no es un elemento que module la expresión del gen de IL-4, y que el LPS no modifica la inducción de este gen en células sin Lyn, pero si participa en una fracción de la respuesta en células silvestres. Un aspecto que llamó la atención en células Lyn^{-/-} durante la detección tanto de IL-4 como de IL-2, es que la presencia del LPS indujo la síntesis del mensajero en cuestión solo que en magnitudes diferentes.

La regulación del gen de IL-4 comprende una serie de elementos en su región promotora que ayudan a la expresión genética. Un primer elemento es el denominado ARE que comprende uno de los cinco sitios P (P0-P4), el cual es esencial para la inducción del gen de IL-4 (37). Esta secuencia tiene mucha similitud con las secuencias que median la unión a NF-AT, por lo que se piensa que pueden unir proteínas tipo NF-AT. Sin embargo, NF-AT como tal, participa activamente en la regulación del transcrito de IL-4 a través de la liberación de calcio. El cual es necesario

para que se desfosforile y active NF-AT (38). La isoforma de este factor de transcripción es NF-ATc. AP-1, mediante sus componentes Jun y Fos, también es un elemento que une a la región promotora de este gen. Otro componente de la familia AP-1 involucrado en la regulación del RNAm de IL-4, es c-maf, no obstante este está expresado en células T y no células cebadas (37). Otro factor de transcripción que utiliza la región promotora, es NIP45, el cual puede sinergizar la expresión del transcrito de IL-4 junto con NF-AT, sin embargo se desconoce como se regula tal fenómeno. NIP45, participa también en la regulación de otros genes mediante su asociación con NF-AT. Un factor que también está relacionado con la expresión genética de IL-4 es STAT6, el cual al estar afectado en las células cebadas anula los niveles de IL-4. Un miembro de la familia Ets llamado PU.1 en conjunto con GATA-1, 2 y Pit1a, son factores de transcripción que se unen a sus secuencias respectivas en el promotor de IL-4 (37). Otros factores de transcripción que participan en la regulación del gen de IL-4, incluyen MAF, GATA-3 e IRF4, los cuales pueden incrementar la expresión de este gen en células T (35).



La regulación de la expresión de IL-2 e IL-4 incluyen una variedad amplia de factores de transcripción, los cuales abarcan diversas isoformas de NF-AT, las cuales como se

ha dicho dependen de la presencia de calcio intracelular obtenido de la liberación al citoplasma. Un aspecto que resalta de la figura 18 es que las células $Lyn^{-/-}$ tratadas únicamente con LPS, pueden inducir la expresión del transcrito para cada caso. Los componentes señalizadores hasta ahora descritos para la vía del TLR-4, no se asocian con alguna proteína que promueva la salida de calcio de las pozas intracelulares, lo cual indicaría que la inducción de los transcritos de IL-2 y 4 en tales casos se debe a que la ausencia de la cinasa Lyn sensibiliza discretamente al sistema celular en términos de liberación de calcio, lo que ayudaría a la inducción una activación mínima de componentes NF-AT necesarios para la inducción de los transcritos. Sin embargo, esto no es claro ya que en las células $Lyn^{+/+}$ tratadas con LPS se observó una ligera inducción del transcrito del gen de IL-4. Por otra parte, los genes de IL-2 e IL-4 poseen en sus promotores una secuencia para la unión de NF- κ B por lo que estas regiones pueden explicar por qué en las células $Lyn^{-/-}$ preincubadas con LPS se observó la inducción de los transcritos de IL-2 e IL-4 (36 y 39.).

Como se ha mencionado, la activación de las células cebadas puede observarse en diferentes parámetros. El primero abarca los eventos señalizadores que culminan con la desgranulación, la cual caracteriza a la respuesta temprana. Sin embargo, la fase tardía en la activación de este tipo celular comprende la síntesis *de novo* y secreción de varias citocinas. Este último evento es muy importante ya que la respuesta tardía determina los distintos estadios de inflamación en el organismo. Las citocinas son moléculas que ejercen funciones señalizadoras en todas las células del sistema inmune. Las variaciones en el tipo y la cantidad de citocina producida por el sistema inmune pueden estar asociadas a diversos eventos patológicos. No obstante, un estado de reposo también involucra la presencia de diversas citocinas, por lo que las células inmunes, a través de estos mensajeros extracelulares pueden censar el entorno químico en el que se encuentran.

En este trabajo se determinó de manera preliminar la cantidad de IL-2 secretada por las células cebadas de tipo silvestre mostrando que pueden liberar tal citocina solo ante la estimulación antigénica (figura 19). Sin embargo, las células tratadas con LPS, mostraron niveles detectables de IL-2 inducidas por antígeno aunque menores en relación con los niveles secretados por las células silvestres estimuladas en ausencia de LPS. Estos datos sugieren que la presencia de LPS puede desensibilizar la cantidad de citocina secretada al medio extracelular por parte de las células cebadas $Lyn^{+/+}$.

En los datos preliminares de la figura 19 se observó que al igual que las células $Lyn^{+/+}$, las células $Lyn^{-/-}$ secretaron IL-2 en presencia de antígeno, pero los niveles alcanzados por las células $Lyn^{-/-}$, fueron menores. Al averiguar cual era la influencia que la preincubación con LPS tenía en este tipo celular se vio que el LPS tuvo la capacidad de desensibilizar la secreción de IL-2 en las células $Lyn^{-/-}$ desafiadas antigénicamente. Un aspecto que resalta de estos datos preliminares es que las células $Lyn^{-/-}$ mostraron secreción de IL-2 cuando en la figura 18 no mostraron inducción del RNAm de este gen. Una explicación es que las células a las que se les extrajo el RNAm solo fueron estimuladas durante 1 hora, en tanto a las células que se les midió la cantidad de citocina se les estimuló durante 24 horas, esto es, que entre una y 24 horas se induce la síntesis de aquel mensajero de IL-2 que no pudo ser observado en la figura 18, sin embargo se necesitaría el curso temporal para probar esto. Otro dato interesante es que en las células $Lyn^{-/-}$ tratadas únicamente con LPS (figura 18), mostraron una clara inducción del RNAm de IL-2 y de manera sorprendente, el LPS no tuvo la capacidad de inducir su secreción (figura 19).

Conjuntamente, se puede decir que la cinasa Lyn optimiza la secreción de IL-2. Por otra parte, la influencia del LPS parece ser constante en la secreción, es decir, que su presencia desensibiliza la liberación de IL-2 en ambos tipos celulares.

Anteriormente se han medido las cantidades de IL-2 secretada por las células cebadas, una proteína que pesa alrededor de 15.5 kDa (133 aminoácidos), y que induce proliferación en células T (40), y se ha encontrado que la cinasa Lyn puede regular negativamente su secreción ya que al estimular a las células que carecen de tal cinasa, la secreción de IL-2 es alta en comparación con las células tipo silvestre(41). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, difieren en cuanto al papel de Lyn, ya que en nuestro sistema y condiciones experimentales, parece ejercer una función de regulador positivo de la secreción IL-2. Por otra parte, la cinasa que se asocia a la síntesis y secreción de citocina es la cinasa de tirosinas de Bruton (BTK), cuya ausencia en las células cebadas hace que los niveles de IL-2 caigan, incluso por debajo del nivel alcanzado por las células Lyn^{-/-} (42). Este hecho es importante ya que BTK es un elemento que está presente en el sistema de transducción del receptor FcεRI y en el sistema del TLR-4, aunque su papel en este último sistema no es del todo claro. Sin embargo BTK podría estar participando activamente en la regulación de la transcripción y en los eventos postraduccionales de IL-2 mediador por IgE y LPS.

Además de medir las cantidades de IL-2 en el presente trabajo se midieron los niveles de IL-4 liberada por parte de las células cebadas. Esta citocina pesa alrededor de 19 kDa (129 aminoácidos) y su función es la de inducir un cambio en la producción y secreción de isotipo por parte de las células B hacia la IgE (43). En este trabajo la figura 20 mostró de forma preliminar que la estimulación antigénica indujo niveles altos de citocina secretada en comparación con las células que no fueron estimuladas. Cuando se quiso ver si el LPS ejercía influencia alguna sobre la secreción de las células Lyn^{+/+} activadas antigénicamente, los datos preliminares mostraron que el LPS mantiene su función como desensibilizador de la secreción de IL-4.

Las células carentes de la cinasa Lyn reflejaron una clara inducción de IL-4 en presencia de antígeno. Además se vio que la ausencia de la cinasa Lyn puede sensibilizar a las células cebadas ya que en su ausencia, la IL-4 secretada es mayor respecto a las células Lyn^{+/+}. La preincubación con LPS en las células Lyn^{-/-} activadas, hizo que la secreción se disminuyera. Por ello, los datos preliminares obtenidos sugieren que el LPS puede desensibilizar la secreción de IL-4 al igual que la de IL-2 en las células cebadas, y que en el caso de la secreción de IL-4, la cinasa Lyn parece funcionar como un regulador negativo (un aspecto que coincide con lo reportado) (41), ya que en ausencia de esta cinasa los niveles de IL-4 se disparan respecto a los niveles alcanzados por las células Lyn^{+/+}. Este evento fue contrario a lo que pasó en la secreción de IL-2, por lo tanto, la cinasa Lyn puede regular diferencialmente la secreción de citocinas. Un apunte importante es que aún cuando la falta de estímulo antigénico pudo inducir la síntesis del mensajero en células Lyn^{+/+} y Lyn^{-/-}, éste no indujo la secreción de IL-4 por lo que la estimulación antigénica es importante para la liberación de esta citocina por parte de las células cebadas.

En la literatura se ha reportado que la secreción de IL-4 depende de la movilización de calcio, esto ha sido observado al estimular células cebadas con ionomicina (un ionóforo de calcio), el cual permite el flujo de calcio al citoplasma de las células cebadas, y los niveles de IL-4 son elevados (44). Resultados similares se han obtenido con la estimulación a través del receptor FcεRI, que se sabe, en su cascada de señalización existen elementos que llevan a la movilización de calcio intracelular. Por otro lado, la presencia del LPS en los datos preliminares careció de influencia sobre la secreción de IL-4, un aspecto que también se observó en la secreción de IL-2, debido a que la vía del TLR-4 no moviliza calcio. Sin embargo no se había reportado la influencia del LPS como un agente que puede desensibilizar la secreción de citocinas.

7. CONCLUSIÓN

Con los resultados presentados se puede concluir que:

1. Las concentraciones de IgE juegan un papel determinante en la intensidad de la liberación de los gránulos citoplásmicos por parte de las células cebadas, es decir, a medida que la concentración de IgE aumenta, la concentración de antígeno para llegar al umbral de respuesta disminuye.
2. El pretratamiento con LPS no modifica la respuesta temprana de las células cebadas ante la estimulación antigénica.
3. La inducción del mensajero de IL-2 requiere de la cinasa Lyn en respuesta a un estímulo antigénico. Sin embargo, el LPS puede inducir la síntesis de este transcrito activando una vía independiente de Lyn.
4. La cinasa Lyn modula negativamente la vía del TLR-4 inducida por el LPS encaminada a la expresión del gen de IL-2.
5. El pretratamiento con LPS y la cinasa Lyn no afectan la síntesis del mensajero de IL-4.
6. Aunque los datos de secreción indican que la cinasa Lyn puede ser un regulador positivo o negativo en la secreción de IL-2 e IL-4 respectivamente; y que el pretratamiento con LPS desensibiliza tal secreción, es necesario completar la caracterización de Lyn y del pretratamiento con LPS con más experimentos.

8. REFERENCIAS

1. Abul K Abbas and Andrew H. Litchman. *Cellular and molecular immunology*. Ed. Elsevier, 5th edition. USA (2005)
2. Janeway *et al.* *Immunobiology*. Garlandscience USA (2001)
3. María Concepción Castells. Mast cells: *Molecular and cell biology*. Rev. Esp. Alergol. Inmunol Clin. 6:327-39 (1997)
4. Aalberse *et al.* *Structural features of allergenic molecules*. Chem. Immunol. Allergy. 91:134-46 (2006)
5. Stephen J. Galli, Janet Kalesnikoff, Michele A. Grimaldeston, Adrian M. Piliponsky, Cara M. M. Williams y Mindy Tsai. *Mast Cells as Tunable Effector and Immunoregulatory Cells: Recent Advances*. Annu. Rev. Immunology 23: 749-86 (2005)
6. David M. Edgar. *Immunology*. Ed 1th edition. USA (2005)
7. Alasdair M. Gilgfillan and Christine Tkaczyk. *Integrated signalling pathways for mast-cell activation*. Nature Rev. 6:218-30 (2006)
8. Adelman *et al.* *Manual of Allergy*. 4th edition Ed. Lippincott Williams and Wilkins USA, (2002)
9. Clifford A. Lowell. *Src-family Kinases: rhoestats of immune cell signalling*. Elsevier, Molecular Immunology. 41: 631-643 (2004).

10. Koichiro Maeno, Kiyonao Sada, Shinkou Kyo, Shanjahan Miah, Keiko Kawauchi, Xiujuan Qu, Yuhong Shi and Hirohei Yamamura. *Adaptor protein 3BP2 is a potencial ligand of Src Homology 2 and 3 domains of Lyn Protein Tyrosine Kinase.* Journal of biological chemistry. 27: 24912-24920. (2003)
11. Mónica J. S. Nadler and Jean Pierre Kinet. Uncovering new complexities in mast cell signaling. Nature Immunol 3:707-08 (2002)
12. J. Rivera, Y. Furumoto, C. Gonzales-Espinosa, M. Kovarova, S. Odom y V. Parravicini. *Functional coupling of FcεRI Employs two Proximal Src Family Kinases.* Allergy Clin. immunol Int: J. World Allergy Org. Supplement 1: 152-156 (2004).
13. Ana Olivera, Nicole Urtz, Kiyomi Mizugishi, Yumi Yamashita, Alasdair M. Gilfillan, Yasuko Furumoto, Hihua Gu, Richard L. Proia, Thomas Baumruker and Juan Rivera. IgE-independent a Activation of Sphingosine Kinase I and 2 and Secretion of Sphingosine 1-Phosphate Required Fyn Kinase and Contributes to Mast Cell Response. Journal Bio. Chem. 281: 2515-525 (2006)
14. Valentino Parravicini, Massimo Gadina, Martina Kovarova, Sandra Odom, Claudia Gonzales-Espinosa, Yasuko Furumoto, Shinichiroh Saitoh, Lawrence E. Samelson, John J. O'Shea and Juan Rivera. *Fyn kinase anitiates complementary signal required for IgE-dependient mast cell degranulation.* Nature Immunol 1-8 (2002)
15. Sandra Odom, Gregorio Gomez, Martina Kovarova, Yashuko Furumoto, John J. Ryan, Harry V. Wright, Claudia Gonzalez- Espinosa, Margaret L. Hibbs, Kenneth W. Harder y Juan Rivera. *Negative Regulation go Immunoglobulin E-dependent*

- Allergic Responses by Lyn Kinase*. The Journal of Experimental Medicine. 199: 1-13 (2004)
16. Ruslan Medzhitov. *Toll-like Receptors and Innate Immunity*. Nature Rev. 1:135-44 (2001)
17. S. Janssens and R, Beyaert. *Role of Toll-like Receptors in Pathogen Recognition*. Clin. Microbio. Rev. 16:637-46 (2003)
18. Shizuo Akira y Kiyoshi Takeda. *Toll-like Receptors Signalling*. Nature Rev Immunol. 4: 499-511 (2004)
19. T. Kawai and S. Akira. TLR signalling. Cell Death and Differentiation. 1-10 (2006)
20. Fu et al. Dioscorin isolated from *D. alata* activates TLR4-signalling pathways and induces cytokine expression in macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications 339:137-44 (2006)
21. Alberts et al. *Molecular biology of the cell*. Garlandscience USA (2002)
22. Varki et al. Essentials of glycobiology. CSHL press. La Jolla Cal. USA (1999)
23. Foo Y. Liew, Damo Xu, Elizabeth K. Brint and Luke A. J. O'Neil. *Negative Regulation of Toll-like Receptors-Mediated Immune Response*. Nature Rev. 5: 446-457 (2005)
24. Kiyoshi Takeda. *Evolution and Integratio of Innate Immune Recognition Systems: The Toll-like Receptors*. Journal of End. Res. 11: 51-55 (2005)

25. Akio Masuda, Yasunobu Yoshikai, Keiko Aiba y Tetsuya Matsuguchi. *Th2 Cytokine Production from Mast Cells Is Directly Induced by Lipopolysaccharid and Distinctly Regulated by c-Jun N-Terminal Kinase and p38 Pathways*. The Journal of Immunol. 169: 3801-3810 (2002)
26. Nigo et al., *Regulation of allergic airway inflammation through Toll-Like receptor 4-mediated modification of mast cell function*. PNAS. 103: 2286-2291 (2006)
27. Yasuko Furumoto, Satoshi Nunomura, Tomoyoshi Terada, Juan Rivera and Chisei Ra. *The FcεRI beta Immunoreceptor Tyrosina Based- Activation Motif exerts inhibitory control an Mapk an IκB hosphorilation and mast cells cytokine production*. The Journal of Biol. Chem. 47: 49177-49187 (2004).
28. Ravi Malaviya, Teruo Ikeda, Elaine Ross and Soman N. Abraham. *Mast cell Modulation of Neutrophil influx and Bacterial clearance at Sites of Infection through TNF-α*. Nature 381: 77-80 (1996)
29. I. Sabroe, L. C. Parker, A. G. Wilson, M. M. B. Whyte and S. K. Dower. *Toll-like Receptors in Allergy and non-Allergic Inflammatory Disease*. Clin. Exp. Allergy. 32:984-89 (2002)
30. Vivien W. F. Chan, Fanying Meng, Philippe Soriano, Anthony L. DeFranco and Clifford A. Lowell. *Characterization of the B Lymphocyte Populations in Lyn-Deficient Mice and de Role of Lyn en Signal initiation and Down-Regulation*. Immunity. 7: 69-81 (1997)

31. Pecht *et al.* *Cutting edge: Death of dogma or enforcing the artificial: monomeric IgE binding may initiate mast cell response by inducing its receptor aggregation.* Journal of Immunology 174:4461-464 (2005)
32. Jiro Kitaura, Jinming Song, Mindy Tsai, Koichi Asai, Mari Maeda-Yamamoto, Attila Mocsai, Yuko Kawakami, Fu-Tong Liu, Clifford A. Lowell, B. George Barisas, Stephen J. Galli and Toshiaki Kawakami. *Evidence that IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of the FcεRI.* PNAS 100:12911-916 (2003)
33. Wenbin Xiao, Hajime Nishimoto, Hong Hong, Jiro Katamura, Satoshi Nunomura, Mari Maeda-Yamamoto, Yuko Kawakami, Clifford A. Lowell, Chisei Ra and Toshiaki Kawakami. *Positive and Negative Regulation of Mast Cell Activation by Lyn Via the FcεRI.* Journal of Immunol. 175: 6885-892 (2005)
34. Daisuke Hata, Jiro Kitaura, Stephen E. Hartman, Yuko Kawakami, Takashi Yokota and Toshiaki Kawakami. *Bruton's Tyrosine Kinase-mediated Interlukin-2 Gene Activation in Mast Cells.* Journal of Biol. Chem. 273: 10979-987 (1998)
35. Fernando Macian. *NFAT Proteins: Key Regulators of T-cell Development and Function.* Nature Rev. Immunol. 472-484 (2005)
36. Eva L. Decker, Nina Nehmann, Eva Kampen, Hermann Eibel, Peter F. Zipfel and Christine Skerka. *Early Growth Response and Nuclear Factors of Activated T cells forma heterodimers and regulate Proinflammatory Cytokine Gene Expression.* Nucleid Acids Res. 31: 911-21 (2003)
37. Juan Rivera *et al.* *Regulation of IL-4 Expression in Mast Cells.* Singal Tranduction in Mast Cells. Springer. USA (1999).

38. Thomas Baumruker and Eva E. Prieschl. *FcεRI-Mediated Activation of NFAT. Signal Transduction in Mast Cells.*
39. Marone *et al.* *Asthma and allergic diseases.* Academic Press. USA (1999).
40. Katherine A. Fitzgerald *et al.* *The Cytokines Facts book.* 2^a edición. Ed. Academy express, California, USA, pp:51-5 (2001)
41. Valerie Hernandez-Hansen, Julie D. J. Bard, Christy A. Tarlenton, Julie A. Wilder, Clifford A. Lowell, Bridget S. Wilson and Janet M. Oliver. *Increased Expression of Genes Linked to FcεRI Signaling and to Cytokine and Chemokine Production in Lyn-Deficient Mast Cells.* Journal of Immunol. 175: 7880-888 (2005)
42. Yuko Kawakami, Jiro Kitaura, Anne B. Satterthwaite, Roberta M. Kato, Koichi Asai, Stephen E. Hertman, Mari Maeda, Clifford A. Nowell, David J. Rawlings, Owen N. Witte, and Toshiaki Kawakami. *Redundant and Opposing Functions of Two Tyrosine Kinases, Btk and Lyn, in Mast Cells.* Journal of Immunol. 165: 1210-219 (200)
43. Katherine A. Fitzgerald *et al.* *The Cytokines Facts book.* 2^a edición. Ed. Academy express, California, USA, pp: 57-8 (2001)
44. Michael Stassen, Christian Muller, Martina Arnold, Lothr Hultner, Stefan Klein, Christine Neudorfl, Tanja Reineke, Edgar Serfling and Edgar Schimtt. *IL-9 an IL-13 Production by Activated Mast Cells Is Strongly Enhanced in the Presence of Lipopolysaccharide: NF-κB Is Decisively Involved in the Expression of IL-9.* Journal of Immunol. 166: 4391-398 (2001)

Apéndice 1: Soluciones

Buffer Tyrode's

NaCl 7.88 gr
KCl 0.372 gr
MgCl₂ 0.203 gr
CaCl₂ 0.264 gr
Glucosa 1.009 gr
Hepes 1M pH: 7.0 20 ml
Albúmina 0.5 gr

Ajustar a pH: 7.0 y aforar a un litro con agua millipore

TBE: Tris Boric acid EDTA (Ethylenediaminetetraacetic)

Tris base 54 gr
Ácido bórico 27.5 gr
EDTA 4.2 gr

Ajustar a pH: 8.0 y aforar a un litro con agua destilada

SNET

SDS 1% (w/v)
NaCl 400 mM
EDTA 5 mM
Tris HCl pH: 8.0 20 mM

Apéndice 2: Cálculos para determinar la concentración mínima de IgE

Si sabemos que una célula cebada tiene aproximadamente 1×10^5 receptores FcεRI en su membrana y queremos saber cuantos receptores hay en 1×10^6 células se realiza la siguiente operación:

$$(1 \times 10^5) (1 \times 10^6) = 1 \times 10^{11} \text{ receptores en un millón de células}$$

Si sabemos que la IgE pesa 188 kDa y que su peso molecular expresado en gramos equivale a 1M, entonces se lleva a cabo una regla de tres ocupando el número de Abogadro

$$\begin{array}{l} 188 \text{ gr} - 6.023 \times 10^{23} \\ X - 1 \times 10^{11} \end{array}$$

$$X = 1.88 \times 10^{-10} \text{ gr}$$

Esta cifra redondeada y en nanogramos es: 0.2 ng. Por lo tanto 0.2 ng de IgE serían necesarios para ocupar todos los receptores FcεRI en un millón de células cebadas.

Con este cálculo se demuestra que las dos concentraciones de IgE que se usaron en este trabajo son suficientes para ocupar todos los receptores FcεRI existentes en las membranas de las células cebadas

ABREVIATURAS

µl: microlitros
BMMC: Bone marrow derived mast cell
BSA: Bovin Serum Albumin
BTK: Bruton's tyrosine kinase
Cbp: Csk binding protein
CD14: cluster design 14
CD38: cluster design 38
cDNA: complementary desoxiribonucleic acid
Csk: COOH-terminal Src Kinase
DAG: diacylglycerol)
DEPC : Diethylpyrocarbonate
DNA: Deoxyribonucleic acid
DNP: dinitrophenol
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay
ERK: extracellular signal regulated kinase
FcεRI:Fc epsilon receptor I
Gab2: Grb2-associated binder 2
GADS: Grb2 related adaptor protein
GDP: Guanosine diphosphate
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GTP: Guanosine triphosphate
HSA: human serum albumin
IκB: inhibitor of NF-κB
IFN: Interferon
IgE: Inmunoglobulin E
IKK: inhibitor of nuclear factor-κB-kinase complex
IL-3: Interleukine 3
IP₃: inositol 1, 4, 5-triphosphate
IRAK: IL-1R associated kinase
ITAM: immunoreceptor tyrosine based activated motifs
ITIM: Immunoreceptor tyrosine based inhibition motif
ITIM: immunoreceptor tyrosine based inhibitory motifs
JNK: c-Jun N-terminal Kinase
JNK: JUN N-terminal kinase
kDa: kiloDaltons
LAT: linker for activation of T cells
LPS: lipopolisacharide
LRR: Leucine rich repeats
LTC: Leucotriene
MAPK: Mitogen activated protein kinase
MAPK: mitogen activated protein kinases
MCP: Monocyte chemoattractant protein
MD-2: myeloid differentiation protein 2
MHC: Major Histocompatibility Complex
MIP: Macrophage Inflammatory Protein
MyD88: myeloid differentiation primary-response protein 88
MyD88: Myeloid differentiation primary-response protein 88
NEO: Neomycin

NF- κ B: Nuclear factor κ B
NK: Natural Killer
NTAL: Non T-cell activated linker
OVA: Ovalbumin
p38: protein of 38 kDa
PAMP: Pathogen associated molecular pattern
PCR: Polymerase Chain Reaction
PGL: Prostaglandine
PI3K: phosphatidilinositol 3-kinase
PIP2: phosphatidilinositol 4, 5- biphosphate
PIP3: phosphatidilinositol 3, 4, 5-triphosphato
PKC: protein kinase C
PLA: Phospholipase A
PLC- γ : phospholipase C- γ
PLD: Phospholipase D
PTK: Protein tyrosine kinase
RNA: Ribonucleic acid
RT-PCR: Reverse Transcription polymerase chain reaction
S1P: Sphingosine 1-phosphate
SCF: stem cell factor
SH2: Src homology 2
SH3: Src homology 3
SHIP:SH2-containing inositol 5 phosphatase
SHP-1: SH2-containing protein Tyrosine phosphatasa 1
SK: Sphingosine kinase
Syk: Spleen tyrosine kinase
TAB: TAK1-binding protein
TAK1: Transforming growth factor- β (TGF- β) activated kinase
TCR: T-cell receptor
Th: T helper
TIR: Toll/IL-1 receptor
TIRAP: TIR-domain-containing adaptor protein
TLR4: toll like receptor-4
TNF- α : tumour necrosis factor- α
TRAF: Tumor necrosis factor (TNF)-receptor associated factor
TRAM: TRIF-related adaptor molecule
TRIF: TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- β
TRIF: Toll/Interleikin-1-receptor (TIR)-domain-containing adaptor protein inducing
UBC13: Ubiquitin-conjugating enzyme 13
UEV1A: Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1