



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

**“Efecto de la leptina y el ácido valproico en la activación
de mastocitos”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA**

PRESENTA:

M. en C. Gloria Mariana Rodríguez López

DIRECTORES DEL PROYECTO:

Dr. Rommel Chacón Salinas

Dra. Alma Chávez Blanco

Ciudad de México, 2019



Review Article

Exploring the Drug Repurposing Versatility of Valproic Acid as a Multifunctional Regulator of Innate and Adaptive Immune Cells

Rodolfo Soria-Castro ¹, Alejandro Schcolnik-Cabrera ², Gloria Rodríguez-López ¹,
Marcia Campillo-Navarro,³ Nahum Puebla-Osorio,⁴ Sergio Estrada-Parra,¹
Iris Estrada-García ¹, Rommel Chacón-Salinas ^{1,5}, and Alma D. Chávez-Blanco ²

¹Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), Mexico City, Mexico

²Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología (INCan), México City, Mexico

³Laboratorio de Inmunología Integrativa, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

⁴Department of Lymphoma and Myeloma, The University of Texas, MD Anderson, Cancer Center, Houston, TX, USA

⁵Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to Rommel Chacón-Salinas; rommelchacons@yahoo.com.mx and Alma D. Chávez-Blanco; celular_alma@hotmail.com

Received 29 August 2018; Revised 30 November 2018; Accepted 2 January 2019; Published 14 March 2019

Academic Editor: Patrice Petit

Copyright © 2019 Rodolfo Soria-Castro et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Valproic acid (VPA) is widely recognized for its use in the control of epilepsy and other neurological disorders in the past 50 years. Recent evidence has shown the potential of VPA in the control of certain cancers, owed in part to its role in modulating epigenetic changes through the inhibition of histone deacetylases, affecting the expression of genes involved in the cell cycle, differentiation, and apoptosis. The direct impact of VPA in cells of the immune system has only been explored recently. In this review, we discuss the effects of VPA in the suppression of some activation mechanisms in several immune cells that lead to an anti-inflammatory response. As expected, immune cells are not exempt from the effect of VPA, as it also affects the expression of genes of the cell cycle and apoptosis through epigenetic modifications. In addition to inhibiting histone deacetylases, VPA promotes RNA interference, activates histone methyltransferases, or represses the activation of transcription factors. However, during the infectious process, the effectiveness of VPA is subject to the biological nature of the pathogen and the associated immune response; this is because VPA can promote the control or the progression of the infection. Due to its various effects, VPA is a promising alternative for the control of autoimmune diseases and hypersensitivity and needs to be further explored.

1. Introduction

The short-chain 2-*n*-propyl-pentanoic fatty acid, also known as valproic acid (VPA), is soluble in organic solvents and stable at room temperature. VPA was created as an analogue of valeric acid, or pentanoic acid, extracted from *Valeriana officinalis* [1]. VPA is the most used drug for the multiple types of epilepsy, including tonic-clonic or grand mal seizures, complex partial seizures, tonic seizures

including Lennox-Gastaut syndrome, and absence or petit mal seizures [2, 3]. Furthermore, this compound is used to treat manic syndrome and migraines [4], and due to its effect as a histone deacetylase inhibitor (HDACI), several studies have analyzed its potential therapeutic use for diseases such as HIV and cancer [3, 5, 6]. Although VPA might induce hepatotoxicity and teratogenicity, it is one of the safest anticonvulsant compounds in current use [7].

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología Molecular II y el Laboratorio de Inmunología “Dr. Sergio Estrada Parra” del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Rommel Chacón Salinas y la Dra. Alma Delia Chávez Blanco.

Durante el desarrollo de la tesis el sustentante fue becario de CONACyT con número de registro 275576.

Este proyecto fue financiado por el proyecto CONACyT Ciencia Básica con registro 258738, la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional, así como a través del Proyecto de Investigación de UDIBI con el código FTU/PRO/P3/19/001-PRO.

A mis abuelitos Carlos, Luis, Petrita y Belén

A mis padres Gloria López Flores y Favio Rodríguez Casilda

A mis hermanos Fabio Alberto y Luis Manuel

Con todo cariño y agradecimiento

Todo lo que soy y lo que he hecho es por ustedes

Agradecimientos

- ♥ Al Dr. Rommel Chacón Salinas y la Dra. Alma D. Chávez Blanco, directores de este proyecto, por su confianza, asesoramiento y apoyo incondicional. Gracias por formar un grupo unido que trabaja en conjunto y enriquece la discusión de proyectos.
- ♥ A los miembros del comité tutorial Dra. Isabel Wong Baeza, Dra. Samira Muñoz Cruz y Dr. Rubén López Santiago. Por enriquecer este proyecto con sus comentarios y sugerencias.
- ♥ A la Dra. Iris Estrada García y el Dr. Sergio Estrada Parra, por todos los años que han invertido en el laboratorio de Inmunología Molecular II, que alberga a tantos estudiantes. Porque a través de una excelente y ejemplar liderazgo han hecho un lugar adecuado y confortable para trabajar y convivir.
- ♥ A la Dra. Jeanet Serafín y la Dra. Claudia Sandoval, por todos los seminarios, correcciones, sugerencias y consejos que me aportaron.
- ♥ A los compañeros que se han graduado y que tuvieron siempre algún comentario para mejorar el proyecto Dra. Marcia Campillo, Dra. Violeta Alvarez, Dr. Kahiry, Dr. Mariano García y Dra. Bibiana Sánchez.
- ♥ A la Q.B.P Claudia Iturbe Haro por su invaluable asistencia técnica, tiempo y paciencia.
- ♥ A la M. en C. Jessica Castañeda, siempre auxiliándome en técnicas, protocolos y materiales.
- ♥ A Araceli por ayudarme con papeles, impresiones, copias, cotizaciones, proveedores y tantas cosas más.
- ♥ Al grupo de “*Mastocitos*”, Marcia, Rodo, Adriana, Yatsiri, Ángel, Elyel y Víctor. Por compartir no solo los proyectos y el trabajo, también los buenos momentos en el laboratorio.
- ♥ A mi amigo y colaborador M. en C. Rodolfo Soria Castro, este trabajo es nuestro.
- ♥ A los “*fofis*” Boogie, Ara, Bibi, Jessi, Jesús, mi estimado profesor Luisito, Mariano y Víctor. Ustedes me ayudaron a sobrevivir, la alegría y diversión siempre se agradece.
- ♥ A mis amigas de tantos años, Anita Sánchez y Adri Gutiérrez, gracias por siempre estar.
- ♥ A los compañeros del posgrado y del laboratorio de Inmunología Molecular II.
- ♥ A José Asencio y Rosy, por hacernos la vida más fácil al momento de los trámites y resolver dudas.
- ♥ A mis abuelos†, mis padres, mis hermanos y toda mi familia. Porque a pesar de la distancia siempre los llevo conmigo. Sus consejos y apoyo siempre me darán la fuerza para seguir adelante y ser mejor. Son lo más importante siempre.
- ♥ A Adrián Retana, por estar al pendiente y compartir parte de esta etapa.

*“Nobody said it was easy,
No one ever said it would be this hard...”*

Coldplay - The Scientist

ÍNDICE

Índice	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas.....	iii
Abreviaturas.....	iv
Resumen	vi
Abstract	vii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Mastocitos.....	1
1.1.1 Funciones biológicas	1
1.1.2 Mediadores	2
1.1.3 Receptor de alta afinidad del fragmento cristalizable de cadena épsilon (FcεRI)	4
1.1.4 Activación dependiente del FcεRI y su asociación a la hipersensibilidad tipo I.....	5
1.1.5 Moléculas asociadas a la regulación de la activación de mastocitos.....	7
1.2 Leptina.....	8
1.2.1 Receptor de leptina.....	9
1.2.2 Efecto de la leptina en células inmunes.....	9
1.2.3 Leptina y reacciones Hipersensibilidad tipo I.....	11
1.3 Ácido valproico.....	12
1.3.1 Efecto del ácido valproico en células del sistema inmune.....	13
2 JUSTIFICACIÓN	17
3 HIPÓTESIS	17
4 OBJETIVO GENERAL	18
4.1 Objetivos particulares	18
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 Diferenciación de mastocitos derivados de médula ósea (BMMC).....	19
5.1.1 Cultivo BMMC	19
5.1.2 Tinción para pureza del cultivo de BMMC	19
5.2 Leptina recombinante murina.....	19
5.3 Ácido valproico.....	20
5.4 Viabilidad celular	20
5.5 Evaluación de la desgranulación por leptina.....	20

5.6	Inducción de la desgranulación vía FcεR.....	21
5.7	Análisis de FcεRI, CD117, CD45 y CD44 en superficie	21
5.8	Cuantificación de citocinas.....	21
5.9	Determinación de proteínas fosforiladas.....	22
5.10	Análisis estadístico	22
6	RESULTADOS	23
6.1	Determinación de la pureza de los cultivos de BMMC	23
6.2	Ensayo de desgranulación de mastocitos con leptina	24
6.3	Leptina no induce la producción de citocinas en BMMC.....	25
6.4	Activación de BMMC vía receptor Fcε	25
6.5	La leptina no afecta la desgranulación de BMMC al estímulo vía FcεRI	26
6.6	Viabilidad de BMMC en presencia de VAP.....	30
6.7	El VAP disminuye la desgranulación en mastocitos dependiente de IgE.....	32
6.8	El VAP disminuye la producción de TNFα, IL-6 e IL-13 al estímulo vía FcεRI	34
6.9	Efecto del VAP en moléculas de superficie	35
6.9.1	El VAP afecta la expresión de FcεRI y CD117 en mastocitos.....	35
6.9.2	La disminución del FcεRI inducida por VAP depende del tiempo	36
6.10	Efecto del VAP en la fosforilación de moléculas clave en la señalización del FcεRI	37
7	DISCUSIÓN	39
8	CONCLUSIONES	44
	BIBLIOGRAFÍA	45

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la vía de señalización del FcεRI en mastocitos.	6
Figura 2. Estrategia de análisis para la determinación de la pureza de los cultivos de BMMC.	23
Figura 3. La leptina no induce desgranulación de BMMC.	24
Figura 4. La leptina no induce producción de IL-6 o TNF-α.	25
Figura 5. Desgranulación de mastocitos inducida vía receptor Fcε.	26
Figura 6. La desgranulación de mastocitos via FcεRI en presencia de leptina.	27
Figura 7. La leptina no incrementa la desgranulación de BMMCs al entrecruzamiento del FcεRI.	28
Figura 8. La leptina no afecta la expresión del receptor FcεRI en los mastocitos.	29
Figura 9. La presencia de leptina no afecta la producción de citocinas al estimular vía FcεRI.	30
Figura 10. La viabilidad de los BMMC no se afecta en dosis bajas de ácido valproico.	31
Figura 11. El VAP disminuye la desgranulación de mastocitos inducida vía FcεRI.	33
Figura 12. El VAP disminuye la producción de citocinas dependiente de la vía FcεRI-IgE.	34
Figura 13. El VAP disminuye la expresión de FcεRI y CD117 en los mastocitos.	35
Figura 14. La disminución en la expresión del receptor Fcε en los mastocitos por el VAP es dependiente del tiempo.	36
Figura 15. El VAP disminuye pPLCγ2.	38

Índice de tablas

Tabla 1. Principales mediadores de los mastocitos.	3
---	---

Abreviaturas

BMMC	Mastocitos derivados de medula ósea
BSA	Albumina sérica bovina
C48/80	Compuesto 48/80
CD	Grupo de diferenciación
DAG	D-1,2-Diacilglicerol
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FcεRI	Receptor Fc epsilon I
fMLP	N-formilmetionil-leucil-fenilalanina
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HACs	Acetiltransferasas de histonas
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN-γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
iHDAC	Inhibidor de desacetilasas de histonas
IL	Interleucina
ITAM	Motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina
JNK	Cinasa N-terminal de c-Jun
LAT	Conector de las células T activadas
LTC4	Leucotrieno C4
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MMC	Mastocitos de mucosa
CTMC	Mastocitos de tejido conectivo
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NFκB	Factor nuclear kappa B

OVA	Ovoalbúmina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PKC	Proteína cinasa A
PLCγ	Fosfolipasa C gamma
PMA	Forbol 12-miristato-13 acetato
RIG-I	Gen 1 inducible por ácido retinoico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
SCF	Factor de células troncales
SFB	Suero fetal de bovino
SLP-76	Proteína de 76 kDa del leucocito que contiene el dominio SH2
SYK	Tirosina-cinasa del bazo
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNP	2,4,6-trinitrofenol
Treg	Linfocito T regulador
VAP	Ácido valproico
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VPF	Factor de permeabilidad vascular

RESUMEN

En los mastocitos, uno de los receptores más estudiados es el receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (FcεRI) ya que su activación está relacionada a la anafilaxis dependiente de IgE. La unión de la IgE a su receptor FcεRI y posterior activación por el antígeno específico induce desgranulación, liberación de mediadores pro-inflamatorios y la síntesis de *novo*, en los mastocitos. El entrecruzamiento de complejo IgE-FcεRI en mastocitos puede ser modulado por diferentes moléculas, como citocinas, hormonas y medicamentos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la modulación de la respuesta de los mastocitos mediada por IgE la hormona leptina (Lep) y por el fármaco ácido valproico (VAP). Los mastocitos se obtuvieron a partir de medula ósea de ratón cultivada en medio suplementado con IL-3 . Se evaluó por citometría de flujo la desgranulación *in vitro* mediada por IgE-FcεR en presencia de VAP o Lep. A partir de esta señal se cuantificaron citocinas mediante la técnica de ELISA y para el caso de las células tratadas con VAP, se evaluaron moléculas de las principales vías de señalización por citometría de flujo. Para el caso de Lep, los mastocitos tienden a presentar una mayor desgranulación de manera dosis dependiente. Al evaluar la producción de citocinas se encontró que a las 24 horas, los mastocitos activados y que estuvieron en presencia de Lep muestran una tendencia a incrementar la producción de citocinas. Por otra parte, el VAP a concentraciones de 1 y 2 mM no mostró un efecto tóxico en los BMMC. Cuando los mastocitos fueron incubados en presencia de VAP y activados a través de FcεRI, presentaron una menor desgranulación, y baja producción de citocinas en comparación con el grupo control. Además el VAP disminuyó la expresión de FcεRI en superficie, pero no de otros receptores en la membrana. Al evaluar la fosforilación de proteínas que participan en la vía de señalización, no se encontró diferencias significativas en la intensidad media de fluorescencia de p-SYK, p-ERK ½, p-AKT y p-P38 pero al analizar p-PLCγ se observó una disminución significativa en el grupo tratado con VAP, lo que podría estar asociado a una disminución en la producción de citocinas y en la desgranulación. Estos resultados demuestran que la activación de los mastocitos a través del entrecruzamiento del receptor FcεRI por IgE puede ser regulada por leptina y VAP.

Abstract

Mast cells act as an important mediator of immune response through a wide array of cell membrane receptors. One of the most studied receptors is FcεRI, whose signalling is dependent of IgE and its activation is associated with type I hypersensitivity reactions. FcεRI mast cell activation by IgE and antigen, induce degranulation, release of leukotrienes and de novo synthesis of pro-inflammatory cytokines. Different molecules, such as cytokines, hormones and drugs, can modulate mast cell crosslinking of IgE-FcεRI complex. The aim of our research was to evaluate if the hormone leptin (Lep) and the drug valproate (VAP), regulate mast cell activation by FcεRI crosslinking. Mast cells were obtained from mouse bone marrow, and cultivated on RPMI medium with 10% SFB and IL-3 (30 ng/ml) for 5-6 weeks. IgE-FcεR degranulation was evaluate by flow cytometer with or without Lep or VAP. In addition, we quantified cytokines by ELISA. Leptin induced a higher degranulation in mast cells activated through IgE-FcεRI than control group, and was dose dependent. Leptin induced a tendency to increase cytokines release at 24 hours in mast cells after activation through FcεRI. On the other hand, 1 and 2 mM of VAP did not show a toxic effect on mast cells. We noticed that VPA attenuated mast cell degranulation and cytokines release after FcεRI crosslinking. Interestingly, VAP treated mast cells showed diminished expression of FcεRI on cell membrane, but not other receptors. When we evaluated the phosphorylation of proteins that are important in intracellular signalling cascade involved in the FcεRI-IgE mast cell response, we did not find a significative difference in the median fluorescence intensity (MFI) of phosphorylated SYK, ERK ½, AKT and P38 on cells treated with VAP. Nevertheless, phosphorylated PLCγ shown a significant reduction in MFI by VAP which could be related to the reduced release of cytokines and degranulation. These results indicate that mast cell response to IgE-FcεRI crosslinking, can be modulated by leptin and valproic acid.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Mastocitos

Los mastocitos o células cebadas fueron descritos por primera vez por Paul Erlich en 1878. En sus tesis doctoral describió que estas células se encontraban principalmente cerca de vasos sanguíneos y tenían la característica de presentar gránulos metacromáticos (por su reactividad a colorantes de anilina) de diferentes tamaños (Crivellato et al. 2003).

Los mastocitos tienen un origen hematopoyético que inicia en medula ósea de la cual emigran los progenitores de mastocitos a circulación. La maduración de estas células culmina en el tejido y depende principalmente de la interacción del factor de células troncales (SCF) con su receptor *c-kit* (CD117), en conjunto con otros factores: IL-3, IL-6, IL-10 e IL-4 (Gurish and Boyce 2002).

Los mastocitos pueden sobrevivir de semanas a meses por lo que se les considera células de larga vida (Padawer 1974; Kiernan 1979) y tienen la capacidad de proliferar bajo ciertos estímulos, incluso después de desgranular (Kuriu et al. 1989; Levi-Schaffer and Shalit 1993). La distribución de los mastocitos en los tejidos es amplia, siendo abundantes en piel, mucosa gastrointestinal y tracto respiratorio (Kitamura 1989; Irani et al. 1986).

Se han identificado dos subpoblaciones de mastocitos histoquímicamente diferentes por el contenido de proteoglicanos e histamina en sus gránulos. Los mastocitos de mucosa (MMC) contienen sulfato de condroitina y poca histamina mientras que los mastocitos de tejido conectivo (CTMC) contienen heparina y grandes cantidades de histamina. Sin embargo, esto aplica solo a roedores por lo que las subpoblaciones de mastocitos en humanos se distinguen por el contenido de triptasa y quimasa o solo triptasa en los gránulos (Kitamura 1989; Irani et al. 1986; Welle 1997).

1.1.1 Funciones biológicas

Los mastocitos, al localizarse en sitios que están en contacto con el medio exterior, son considerados iniciadores de los mecanismos de defensa. Esta respuesta temprana a múltiples estímulos, a través de la liberación de mediadores y el

reclutamiento de otras células efectoras (Welle 1997; Marshall 2004) se debe a la diversidad de receptores de reconocimiento y de activación que expresan. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRS) que abarca: receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores de tipo RIG (RLR), receptores *scavenger* y receptores de lectina tipo C (CLR), permiten que los mastocitos reconozcan patógenos y participen activamente en la respuesta inmune innata ante infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias (Campillo-Navarro et al. 2014).

De igual forma, los mastocitos participan en la respuesta inmune a venenos mediante la degradación de toxinas por proteasas, reduciendo la morbilidad y mortalidad inducida por venenos de abeja, escorpiones y reptiles (Akahoshi et al. 2011; Metz et al. 2006).

Los mastocitos también participan en la reparación del tejido; en una lesión las células son reclutadas, se activan y liberan mediadores contenidos en los gránulos que incrementan la proliferación de fibroblastos y favorecen la producción de colágeno tipo 1 (Abe et al. 2000; Trautmann et al. 2000). Se ha reportado que en ratones deficientes de mastocitos la cicatrización es más lenta, debido a que se reduce la permeabilidad vascular y por consecuencia el reclutamiento de neutrófilos (Weller et al. 2006).

La evidencia de que los mastocitos intervienen en diversas funciones es amplia, sin embargo, la función biológica más estudiada es la asociada a reacciones alérgicas tipo I (anafilaxia y reacciones de hipersensibilidad). Estas respuestas dependen de inmunoglobulina E que al unirse a su receptor y reconocer al antígeno, inducen la liberación de mediadores. Esta activación de forma crónica en los mastocitos, contribuye a la patofisiología de varias enfermedades, principalmente al favorecer procesos inflamatorios y daño al tejido (Galli and Tsai 2012).

1.1.2 Mediadores

Los efectos, benéficos y dañinos, de los mastocitos se atribuyen a la liberación de mediadores preformados (almacenados en los gránulos) y la síntesis de *novo* posterior a la activación. Los mediadores de los mastocitos pueden llegar a tener

más de una función en diferentes células o tener efectos biológicos redundantes (Metcalfe, Baram, and Mekori 1997). De manera general los diferentes mediadores se pueden agrupar en: aminas bioactivas, quimiocinas y citocinas, enzimas, péptidos, proteoglicanos, factores de crecimiento, radicales libres y derivados lipídicos (Tabla 1)(Theoharides et al. 2012).

Tabla 1. Mediadores de los mastocitos	
Modificado de Theoharides et al. 2012	
	Mediadores
Aminas	Histamina, poliaminas
Quimiocinas	IL-8 (CXCL8), MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7), MCP-4, RANTES (CCL5), eotaxina (CCL11)
Enzimas	Carboxipeptidasa A3, quimasas, arilsulfatasas, quinogenasas, triptasa, fosfolipasas, metaloproteinasas de la matriz, β -hexosaminidasa, β -glucoronidasa
Péptidos	Angiogenina, hormona liberadora de corticotropina, endorfinas, endotelina, bradiquinina, renina, somatostatina, sustancia P, urocortina, péptido vasoactivo intestinal
Proteoglicanos	Sulfato de condroitina, heparina, ácido hialurónico
Citocinas	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-16, IL-18, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIF, TGF β , TNF- α , MIP-1 α , MCP-1
Factores de crecimiento	SCF, GM-CSF, β -FGF, neurotropina 3, NGF, PDGF, TGF β , VEGF
Radicales libres	Óxido nítrico
Derivados lipídicos	Leucotrieno B4 y C4, factor activador de plaquetas, prostaglandina D2 y E2

Los gránulos citoplasmáticos contienen cantidades importantes de histamina heparina y proteoglicanos, al igual que proteasas como la carboxipeptidasa, triptasa y quimasas, además de algunas citocinas. Estos productos suelen liberarse de manera inmediata (Wernersson and Pejler 2014). Existe una amplia variedad de estímulos externos que inducen desgranulación algunos ejemplos son: el reconocimiento de anafilotoxinas por los receptores de complemento, algunos

neuropéptidos como la sustancia P, la unión de catelicidinas y defensinas, el ionóforo de calcio A23187, el compuesto 48/80 (Moon, Dean Befus, and Kulka 2014) e incluso ciertas toxinas de venenos de avispas y serpientes (Galli et al. 2016). Pero la desgranulación más estudiada es la asociada al entrecruzamiento del receptor Fcε.

1.1.3 Receptor de alta afinidad del fragmento cristalizable de cadena épsilon (FcεRI)

La expresión de este receptor se describió primeramente en basófilos y mastocitos, pero su distribución es más amplia e incluye monocitos, eosinófilos (Sihra et al. 1997) y células dendríticas de la epidermis, sin embargo, el receptor carece de la subunidad β (Novak, Kraft, and Bieber 2001).

El FcεRI es un heterodímero formado de cuatro subunidades: subunidad α, subunidad β que contiene los motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM) y un dímero correspondiente a la subunidad γ, que también contiene ITAMs (Wernersson and Pejler 2014).

En mastocitos maduros de peritoneo de rata se demostró que la expresión en superficie del FcεRI puede ser inducida por IgE *in vitro* de manera dosis dependiente. *In vivo* los mastocitos de peritoneo de ratones deficientes de IgE (IgE^{-/-}) presentan menor expresión del FcεRI en comparación con los mastocitos de ratones silvestres. La administración de IgE a los ratones IgE^{-/-}, incrementa la expresión del FcεRI funcional para la desgranulación (Yamaguchi et al. 1997).

La unión de IgE monomérica al FcεRI en ausencia de antígeno en los mastocitos promueve la sobrevivencia de las células *in vitro*, esto se ve favorecido en presencia de IL-6. La unión IgE al FcεRI desencadena la fosforilación de proteínas como Erk, p38 y JNK, además de la transcripción de RNAm de diferentes citocinas, sin embargo, no hay desgranulación. (Kalesnikoff et al. 2001; Cruse, Cockerill, and Bradding 2008)

1.1.4 Activación dependiente del FcεRI y su asociación a la hipersensibilidad tipo I

Debido a los efectos que generan los mediadores liberados por los mastocitos al desgranular, se les considera células clave en la patogénesis de los desórdenes alérgicos, tales como la anafilaxia dependiente de IgE y el asma (Yamaguchi et al. 1997). En asma se ha reportado el incremento del número de mastocitos en músculo liso en comparación con sujetos sanos (Brightling et al. 2002). En pacientes con enfermedades atópicas (como rinitis y asma), presentan niveles elevados de IgE sérica. Por lo que, en basófilos la expresión de FcεRI incrementa, como lo había reportado Yamaguchi y colaboradores en mastocitos (Yamaguchi et al. 1997). Además, existe una correlación positiva entre las concentraciones séricas de IgE y la expresión de FcεRI (Sihra et al. 1997).

Una vez que el antígeno (alérgeno) se une a las moléculas IgE asociadas al receptor Fcε (Figura 1), los receptores se agregan y esto causa la fosforilación de los ITAMs dependiente de LYN y la activación de proteínas tirosina cinasas. Desencadenando la fosforilación de varias proteínas adaptadoras, seguido del reclutamiento y activación de varias moléculas de señalización como PLCγ y PI3k. Se generan segundos mensajeros como inositol trifosfato y diacilglicerol, que lleva a la activación de PKC y liberación de calcio del retículo endoplásmico. El incremento del calcio intracelular y la activación de PKC, activa la maquinaria de la desgranulación y la liberación de los mediadores almacenados (Wernersson and Pejler 2014). Esta activación también induce la producción de las citocinas pro inflamatorias IL-6 y TNF-α, además de citocinas del perfil Th2, IL-3, IL-5, IL-13. (Lorentz et al. 2000). En los mastocitos de pulmón la activación vía FcεRI induce la producción de GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos), que contribuye a la activación y supervivencia de los eosinófilos, incrementando la inflamación alérgica (Okayama et al. 1998)

Por lo que los principales efectos patofisiológicos generados por la desgranulación de los mastocitos son: la contracción del músculo liso en vías respiratorias, incremento en la permeabilidad vascular, reclutamiento de leucocitos, dolor y daño al tejido (Theoharides et al. 2012)

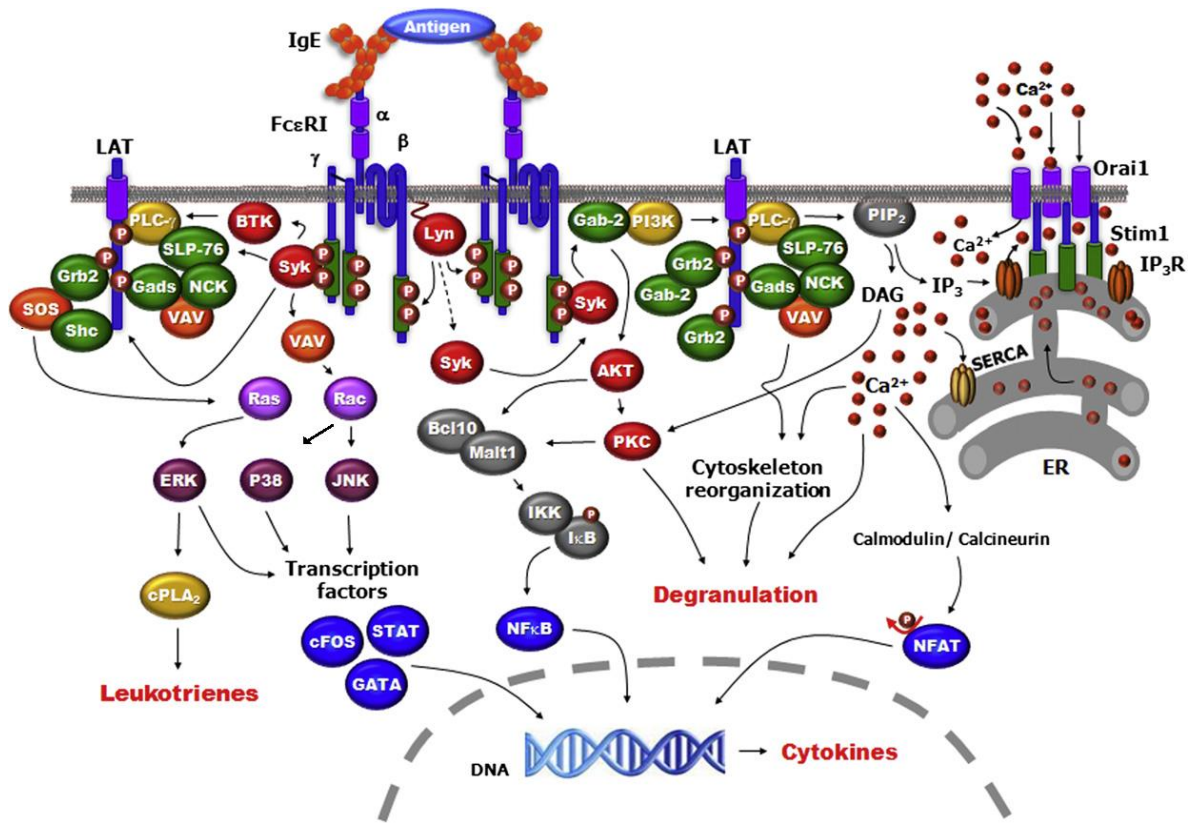


Figura 1. Esquema de la vía de señalización del FcεRI en mastocitos. Una vez que se reconoce el antígeno por la IgE unida al receptor Fcε se inicia la fosforilación en los dominios ITAM de las subunidades β y γ por Lyn. Lo anterior permite el reclutamiento y activación de Syk llevando a la fosforilación de otras proteínas como Btk, PI3K LAT, PLCγ y SLP-76. El complejo multimolecular formado en LAT incluye a Gads, Gab2, SLP-76, PLCγ y Vav. Gab2 se une a la subunidad p85 de PI3K, que cataliza la formación de PI(3,4,5)P3, permitiendo el reclutamiento de PLCγ. La PLCγ hidroliza PI(4,5)P2 para formar DAG e IP3. El ip3 activa a su receptor en el retículo endoplásmico, liberando calcio. El sensor de calcio Stim 1, interactúa con Orai1, permitiendo la entrada de calcio extracelular incrementando el intracelular. DAG activa PKC y también interactúa con calmodulina para activar calcineurina llevando a la translocación de NFAT al núcleo. La activación de GTPasas lleva a la activación de MAP quinasas. Estas vías llevan a la desgranulación, liberación de leucotrienos y síntesis de citocinas. Modificado de (Siraganian et al. 2010)

1.1.5 Moléculas asociadas a la regulación de la activación de mastocitos

En cultivos de mastocitos humanos se ha reportado que IL-4 y SCF, tienen un efecto sinérgico promoviendo la proliferación celular. La presencia de IL-4, en cultivos de mastocitos maduros, favorece la desgranulación por entrecruzamiento del FcεRI (evaluado por la liberación de histamina y LTC₄) y la síntesis de IL-5 (Bischoff et al. 1999).

Respecto a la regulación de la expresión de FcεRI en ensayos in vitro se induce fuertemente FcεRI en presencia de IL-4, durante la diferenciación partiendo de células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical (Toru et al. 1996).

En contraste, los mastocitos derivados de medula ósea obtenidos de ratones C57BL/6 presentan una disminución de la expresión del FcεRI al estimularse con IL-4. Como resultado de esta disminución, la activación de las células a través de esta vía es alterada lo que disminuye el RNAm de citocinas (Ryan et al. 1998).

La IL-10, al igual que la IL-4, disminuye la expresión del FcεRI en cultivos de BMDC de ratón. De manera contraria, la presencia de IL-10 en la activación del receptor Fcε genera un ligero incremento en la desgranulación y una disminución en la producción de *de novo* de TNF-α (Gillespie et al. 2004). En mastocitos humanos se encontró disminución de la expresión de FcεRI en presencia de IL-10, generando disminución de la desgranulación. En el caso de estimulación *ex vivo* a mastocitos de ratones con administración previa de IL-10, la desgranulación generada vía entrecruzamiento del FcεRI no se ve afectada pero si se disminuye la producción de TNF-α (Kennedy Norton et al. 2008). Con estos estudios se demostró el efecto regulador de la IL-10 en la activación vía FcεRI.

Las infecciones respiratorias recurrentes, se consideran un factor clave en el incremento de anticuerpos IgE en pacientes atópicos. Lo que resulta en procesos inflamatorios más fuertes, sugiriendo una asociación entre enfermedades atópicas y una alta susceptibilidad a infecciones (Rantala, Jaakkola, and Jaakkola 2013). Las infecciones por virus, como el virus de la influenza A, rinovirus y el virus sincicial respiratorio, frecuentemente exacerban el asma. Esto se ha relacionado a la

activación de los mastocitos a través de receptores como RIG-I o TLRs. (Revisado en Graham, Temple, & Obar, 2015).

También se ha especulado respecto si anticuerpos IgE generados por ciertos patógenos, pueden exacerbar las reacciones asmáticas. Hahn y colaboradores reportan la presencia de IgE anti *Chlamydia pneumoniae* en la mitad de los pacientes asmáticos. Además de que la presencia de los anticuerpos, se asociaba al grado de severidad del asma (Hahn et al. 2012). En otro estudio se encontró que cerca del 40% de los pacientes con asma presentaban IgE anti enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*. Siendo más frecuente en pacientes con asma severa en comparación con pacientes con asma leve (Bachert et al. 2003). *Mycoplasma pneumoniae* también induce la generación de IgE que incrementan en asma. Recientemente se reportó que la toxina CARDS de esta bacteria incrementa la IgE total e IgE específica anti CARDS en suero (Medina et al. 2017).

Con lo anterior se ha sugerido que diferentes señales del ambiente en el cual se encuentran los mastocitos pueden generar efectos sinérgicos o aditivos que exacerban la respuesta de los mastocitos.

1.2 Leptina

Dentro de los moduladores de la respuesta inmune, recientemente descritos, están las adipocinas. Las adipocinas son hormonas secretadas por el tejido adiposo de manera normal, sin embargo en condiciones de obesidad los niveles se ven incrementados.

La leptina es una adipocina codificada en el *gen ob*, se sintetiza principalmente por los adipocitos y se secreta a la circulación sanguínea. Es un polipéptido de 16 kDa cuyo nombre proviene del griego *leptos* que significa “delgado” (Wada et al. 2014).

La leptina es importante en la regulación de la saciedad, apetito, ingesta de alimentos, reproducción, fertilidad, actividad y gasto energético, por lo que se considera que regula el peso corporal. Esta regulación está dada por la señalización que tiene en el sistema nervioso central, específicamente en el hipotálamo, incrementando los péptidos anorexigénicos y reduciendo el apetito (Fasshauer y Blüher 2015). Los niveles plasmáticos de leptina durante la obesidad incrementan y

se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal y el porcentaje de grasa corporal (Maffei et al. 1995)

1.2.1 Receptor de leptina

El receptor de leptina pertenece a la clase I de receptores de citocinas, al igual que receptor de IL-6. El receptor de leptina se identificó hace 20 años. El gen que lo codifica es el *gen db* y desde su identificación se sospechaba que presentaba diferentes isoformas. Además se sugirió que el receptor estaba involucrado en la transducción de señales en el hipotálamo (Tartaglia et al. 1995).

Actualmente se sabe que el receptor se localiza en el núcleo hipotalámico incluyendo el arcuato, el hipotálamo ventromedial, la región hipotalámica lateral y en el hipotálamo dorsomedial. Sin embargo su distribución no se encuentra restringida a estas zonas, ya que se ha reportado en diferentes tejidos, como el adiposo, corazón, cerebro, pulmón, hígado, bazo, músculo esquelético, riñón y gónadas (Fei et al. 1997).

El gen del receptor codifica para seis formas alternativas, Lep-Ra, Lep-Rb, Lep-Rc, Lep-Rd, Lep-Re y Lep-Rf. Todas presentan el dominio de unión al ligando en la región amino terminal, pero solo la isoforma Lep-Rb presenta una región citoplasmática con el dominio que permite la transducción de señales (Friedman y Halaas 1998; Wada *et al.* 2014).

1.2.2 Efecto de la leptina en células inmunes

Se ha propuesto que las adipocinas juegan un papel específico en la respuesta inmune e inflamación, siendo la leptina la más estudiada debido a su importancia en la obesidad. Desde el descubrimiento de la leptina y su receptor, se ha estudiado su expresión en diferentes tejidos, como los tejidos hematopoyéticos: hígado fetal, médula ósea, bazo y células hematopoyéticas CD45+ en los que se expresa el receptor de leptina (Gainsford et al. 1996)

En neutrófilos de sangre periférica humana el receptor de leptina se expresa en la superficie celular en la isoforma corta. Lo que es suficiente para que al ser estimulados con leptina, incrementa de CD11b y la apoptosis se retrase (Zarkesh-

Esfahani et al. 2004). En un estudio diferente se reportó que la leptina induce en los neutrófilos proliferación y liberación de citocinas como IL-6, TNF- α e IFN- γ (Zarkesh-Esfahani et al. 2001), lo que favorecería la acumulación de neutrófilos en sitios de inflamación (Zarkesh-Esfahani et al. 2004; Bruno et al. 2005). Caldefie-Chezet, Pouli y colaboradores encontraron que la leptina incrementa la migración de los neutrófilos a fMLP, además de aumentar la producción de especies reactivas del oxígeno (Caldefie-Chezet, Poulin y Vasson 2003).

Para el caso de los eosinófilos se ha demostrado la expresión del receptor y al estimular de manera directa con leptina se ha reportado un retraso en la muerte celular por apoptosis (Conus, Bruno, y Simon 2005). Además se ha observado en los neutrófilos un incremento en la expresión de proteínas de superficie, inducción de migración y liberación de IL-6, IL-1 β y MCP-1 (Kato *et al.* 2011; Wong, Cheung, y Lam 2007).

La leptina en los basófilos genera migración de manera dosis dependiente, induce la desgranulación de manera directa y estimula la síntesis de IL-4 e IL-13 (Suzukawa et al. 2011).

Además de esto se ha demostrado que la leptina en macrófagos promueve la producción de citocinas e incrementa la fagocitosis (Gainsford et al. 1996). En la línea celular J774A.1 (macrófagos de ratón) estimulada con diferentes concentraciones de leptina, se encontró que la leptina de manera directa no induce la liberación de óxido nítrico o PGE2 (prostaglandina). Sin embargo, el conjunto leptina e IFN- γ incrementa ambas moléculas. Demostrando sinergismo de la leptina con IFN- γ (Raso et al. 2002).

En los mastocitos que residen en tejido adiposo, se ha demostrado la presencia del receptor y la síntesis de leptina (Taldeman et al. 2009). En el modelo de obesidad, inducida por deficiencia de leptina, los mastocitos se distribuyen diferencialmente tanto en los depósitos grasos abdominales (incrementando en estos) como en los nódulos linfoides abdominales, sugiriendo que la reubicación anatómica está ligada a la inflamación del tejido adiposo y la respuesta inmune (Altintas et al. 2012).

Un estudio reciente demostró que los mastocitos del tejido adiposo de humanos y ratones con normopeso carecen de la expresión de leptina, promoviendo un perfil antiinflamatorio. En obesidad, el incremento de leptina parece estimular a los mastocitos del tejido adiposo induciendo la producción de MCP-1 y citocinas proinflamatorias como el IFN- γ (Zhou et al. 2015).

En mastocitos de peritoneo de rata se demostró que la leptina puede inducir la expresión de su propio receptor. De manera directa la leptina genera migración, liberación de calcio, desgranulación de manera dosis dependiente y síntesis de CCL3 (Żelechowska, Agier, et al. 2018; Żelechowska, Wiktorska, et al. 2018)

En resumen la leptina puede ejercer diferentes actividades dependiendo de la célula sobre la que actúa y el microambiente.

1.2.3 Leptina y reacciones Hipersensibilidad tipo I

La obesidad se considerada como factor de riesgo para otros padecimientos, como diabetes, hipertensión e inclusive asma (Sideleva, Black, y Dixon 2013).

En un modelo de asma inducida por ovoalbúmina (OVA) en ratones, se demostró que la administración exógena de leptina exacerba la severidad de la respuesta al reto con OVA, se elevan los niveles séricos de IgE en suero y la producción de IL-4 e IL-13 en comparación con el grupo testigo que recibió solución salina (Shore et al. 2005).

Uno de los modelos usados para inducir obesidad es el de ratones deficientes de leptina. En estos ratones se ha demostrado que al sensibilizar y retar posteriormente con OVA, se incrementa la hiperrespuesta pulmonar, infiltrado celular y citocinas proinflamatorias (Johnston et al. 2007). Para el caso de pacientes con obesidad y asma se han encontrado resultados similares a los modelos de ratón (Fitzpatrick, Joks, y Silverberg 2012). Ya que la reducción del índice de masa corporal y de los niveles séricos de leptina, disminuyen la intensidad y frecuencia de los cuadros alérgicos (van Huisstede et al. 2015).

Lo anterior sugiere que en un estado de obesidad, el incremento de leptina de forma sistémica podría estar afectando la activación de los mastocitos favoreciendo la exacerbación de la patofisiología de la enfermedad.

1.3 Ácido valproico

El ácido valproico (VAP) es un ácido graso de cadena corta, que se descubrió tenía propiedades antiepilépticas. Sintetizado por primera vez por Burton en 1882, el VAP es un derivado del ácido valerico proveniente de la raíz de la planta *Valeriana officinalis*. El VAP es usado en la clínica como una anticonvulsivante con un espectro de acción muy amplio, además de ser un estabilizador del estado de ánimo. (Chateauvieux et al. 2010)

La eliminación del VAP del cuerpo es lenta, ya que presenta una alta unión a proteínas. Se ha descrito que el VAP se metaboliza a través de tres rutas: la glucuronidación, la β oxidación en mitocondria y la oxidación mediada por citocromo P450 (Godhe-Puranik et al. 2013).

La forma en la que el VAP ejerce su función a nivel cerebral, es modificando la actividad del ácido gamma-aminobutirato (GABA). A través de varios mecanismos, se promueve la inhibición de la degradación del GABA o se favorece su síntesis (Chateauvieux et al. 2010). Además de esto, el VAP tiene la capacidad de disminuir los disparos sostenidos y repetitivos de las neuronas por el bloqueo de canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje (Godhe-Puranik et al. 2013).

Otra forma en la que el VAP actúa, es como inhibidor de las desacetilasas de histonas (iHDAC). Las desacetilasas de histonas reducen la acetilación en el núcleo de las histonas, llevando cambios en la estructura de la cromatina que impiden la expresión de genes. Por el contrario la hiperacetilación de blancos endógenos de las acetilasas de histonas (HACs), favorece la transcripción (Phiel et al. 2001).

Esta característica del VAP como iHDAC ha sido evaluada como una posible terapia para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Se ha encontrado que el VAP reduce la proliferación o supervivencia de células transformadas. Además disminuye el tamaño de tumores sólidos y reduce la metástasis (Gottlicher et al. 2001).

Las modificaciones epigenéticas, generadas por el VAP en células tumorales, han sido estudiadas a detalle. En conjunto al estudio del efecto que podría tener el VAP en células de la respuesta inmune asociadas al tumor o antitumoral, llevaría a mejoras en la inmunoterapia (Kroesen et al. 2014).

1.3.1 Efecto del ácido valproico en células del sistema inmune

De manera general la administración crónica de medicamentos antiepilépticos puede generar efectos adversos en el sistema inmune, que pueden llevar a complicaciones severas como el síndrome de hipersensibilidad por antiepilépticos caracterizado por inflamación y daño a órganos. Se ha demostrado que los medicamentos antiepilépticos tienen la capacidad de afectar directamente tanto la inmunidad humoral como la inmunidad celular, alterando la síntesis de citocinas principalmente (Beghi and Shorvon 2011).

Respecto a los efectos específicos del VAP en pacientes, se ha reportado trombocitopenia, leucopenia, principalmente neutropenia (Munster et al. 2009; Vesta and Medina 2003). En la línea celular HL-60, diferenciada a un fenotipo tipo neutrófilo, el VAP induce apoptosis. Lo anterior por la disminución del potencial de membrana mitocondrial, resultando en la activación de caspasa 9 y subsecuentemente caspasa 3. Lo que genera condensación y fragmentación del núcleo (Vrba, Dolezel, y Ulrichova 2010).

Se ha analizado si el VAP afecta la respuesta inmunológica, en ensayos *in vitro* se demostró que el pretratamiento de líneas celulares de monocitos y macrófagos estimulados con LPS y pre tratados con VAP, afecta la activación de NF- κ B y disminuye la liberación de TNF- α e IL-6 (Ichiyama et al. 2000; Jambalagini et al. 2014).

En el caso de la respuesta ante infecciones bacterianas, se ha reportado que el reconocimiento a través de TLRs y la capacidad fagocítica en los macrófagos, se afecta al usar VAP. Lo que altera la eliminación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, al disminuir las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (Mombelli et al. 2011). Así mismo, el VAP disminuye nitritos y la óxido nítrico sintasa inducible, a través de la acetilación de Stat1 (Lucie et al. 2007), afectando las funciones

antimicrobianas. Caso contrario a lo que ocurre en macrófagos J774 tratados con VAP, infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y estimulados con IFN- γ , en los que disminuye el crecimiento intracelular de la micobacteria al incrementar la producción de óxido nítrico (E. Nieto-Patlán et al. 2019).

Otra estirpe celular de la inmunidad innata y que además está asociada a la respuesta inmune antitumoral, son las células NK. Estas células al ser tratadas con VAP, disminuye de manera dosis dependiente la desgranulación y por ende su actividad lítica contra células leucémicas. Lo anterior se asocia a la disminución en la expresión en superficie del receptor de activación NKG2D, molécula importante en la respuesta antitumoral (Shi et al. 2016). También se encontró que las enzimas citotóxicas: perforina y granzima disminuyen de manera dosis dependiente en presencia de VAP. Cuando se estimulan NKs con IL-12 e IL-18, las células que estuvieron en presencia de VAP disminuyen la producción de IFN- γ . (Alvarez-Breckenridge et al. 2012).

En células dendríticas maduras, obtenidas a partir de monocitos humanos, se encontró que el tratamiento con VAP disminuye moléculas como HLA-DR y CD86 y la producción de citocinas. La capacidad de las células dendríticas de activar linfocitos T en co-cultivos se afecta, evidenciándose una reducción de células CD4+ IFN- γ +. Las alteraciones en las propiedades funcionales celulares también ocurrieron en los co-cultivos de linfocitos T CD8+ con células dendríticas tratadas con VAP, al disminuir las células CD8+ IFN- γ + y la liberación de granzimas (Frikeche et al. 2012).

Resultados similares, en la disminución de citocinas y de moléculas co-estimuladoras, fueron reportados por Arbez y colaboradores en células dendríticas plasmacitoides humanas. Respecto a la activación, los linfocitos T CD4+ IL-10+ incrementaron de manera significativa en los co-cultivos con células dendríticas plasmacitoides tratadas con VAP.(Arbez et al. 2014).

Cuando los linfocitos T CD4+ de ratón son polarizados *in vitro* a través de citocinas en presencia de VAP, se reduce el porcentaje de células Th1 y Th17, ya que se

disminuye el porcentaje y síntesis de IFN γ e IL-17. Lo anterior es dependiente de la baja fosforilación de Akt que induce el VAP (Long et al. 2015).

Para el caso de los linfocitos T reguladores (Treg) CD4+ FOXP3+ se ha propuesto que los iHDAC pueden incrementar su capacidad reguladora. Akimova y colaboradores lograron demostrar que el VAP incrementa la expresión de CTLA-4 en Treg humanas en ensayos de supresión, lo que podría estar favoreciendo la inmunosupresión de estas células sin afectar la expresión de FOXP3+. (Akimova et al. 2010).

En linfocitos T $\gamma\delta$ humanos se encontró que el VAP inhibe la proliferación e incrementa la muerte celular. En las células que permanecieron viables, se disminuyó la expresión del receptor NKG2D, lo que afectaría su capacidad citotóxica independiente de MHC (Bhat, Oberg y Kabelitz 2015).

Ya se había reportado previamente que el VAP podría afectar la diferenciación celular en leucocitos desde medula ósea (Bartels et al. 2012). En los linfocitos B de humanos tratados con VAP se retrasa y reduce la expresión de marcadores de plasmablastos, además de alterar la secreción de inmunoglobulinas (Kienzler et al. 2013).

Lo anterior indica que el VAP no solo afecta células neuronales o cancerígenas, también presenta un efecto en diferentes células del sistema inmune. Este papel inmunomodulador presenta una tendencia a disminuir factores pro-inflamatorios y favorecer la regulación.

El efecto que tiene el VAP en los mastocitos ha sido poco estudiado. En la línea celular humana HMC1.2, el VAP afecta la proliferación celular y la viabilidad de manera dosis dependiente (Lyberg et al. 2017). Pero no hay estudios que describan si su activación se ve afectada. Una forma de asociar indirectamente a los mastocitos y el VAP, ha sido a través de modelos *in vivo*. En un modelo de alergia a ovoalbúmina, se observó que el VAP disminuye el grosor del epitelio pulmonar lo que aparentemente mejora la capacidad respiratoria (Royce y Karagiannis 2012). Algunos autores han sugerido que el uso de VAP y otros iHDAC como tratamiento

de enfermedades alérgicas (Royce, Ververis y Karagiannis 2012). Ya que se ha obtenido evidencia experimental de otros iHDAC como la tricostatina, un antibiótico antimicótico, que en mastocitos reduce la desgranulación y liberación de citocinas dependiente de IgE, a través de la disminución FcεRI. Sin embargo, las dosis usadas también inducen apoptosis (Krajewski et al. 2018). Otro ejemplo es el butirato, un ácido graso de cadena corta, que suprime la liberación de TNF e IL-6 sin modificar la desgranulación en los mastocitos (Zhang et al. 2016).

2 JUSTIFICACIÓN

La respuesta de los mastocitos a través de su receptor de alta afinidad para IgE, puede ser modulada por diferentes señales presentes en el ambiente, como citocinas, hormonas o ciertos patógenos. Sin embargo, no se ha evaluado si otros factores como adipocinas o fármacos con función de iHDAC pueden afectar la activación a través del receptor Fcε de alta afinidad. Ya se ha demostrado la capacidad de la leptina y del ácido valproico como inmunomoduladores de otras estirpes celulares de la respuesta inmune, pero en el caso de la activación de mastocitos aún se desconoce. El estudio de la acción de estos compuestos en la activación clásica del mastocito vía FcεRI, permitirá dilucidar que otros factores podrían modular la respuesta de hipersensibilidad tipo I.

3 HIPÓTESIS

Los mastocitos tratados con leptina, presentarán una mayor desgranulación e incremento de citocinas proinflamatorias al ser estimuladas vía receptor FcεRI. De manera contraria los mastocitos tratados con ácido valproico tendrán menor desgranulación y producción de citocinas al ser estimulados vía receptor FcεRI.

4 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la leptina y el ácido valproico en la activación de los mastocitos

4.1 Objetivos particulares

1. Determinar si la leptina induce desgranulación de los mastocitos
2. Investigar si la leptina induce la producción de citocinas en mastocitos
3. Evaluar si la desgranulación y producción de citocinas dependiente del receptor Fc ϵ RI de los mastocitos es afectada por la leptina.
4. Analizar si el VAP afecta la viabilidad de los mastocitos.
5. Evaluar si el VAP modula la desgranulación y producción de citocinas dependiente del receptor Fc ϵ RI en los mastocitos.
6. Medir la expresión del receptor Fc ϵ RI en los mastocitos tratados con VAP.
7. Determinar si la vía de señalización del receptor Fc ϵ RI en mastocitos es afectada por el VAP.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diferenciación de mastocitos derivados de médula ósea (BMMC)

La obtención de médula ósea de ratón fue realizada de acuerdo al protocolo aprobado por el comité de ética en investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, con el registro: CEI-ENCB 006/2013.

5.1.1 Cultivo BMMC

Ito y colaboradores reportaron que la exposición de BMMC crónica a SCF, genera una cierta resistencia a la desgranulación inducida vía FcεRI, por lo anterior se implementó el protocolo de extracción usando exclusivamente IL-3 (Ito *et al.* 2012). Se extrajo médula ósea a partir de fémures de ratones C57BL6 en condiciones de esterilidad. Las células obtenidas se diferenciaron durante un periodo de 5 a 8 semanas con 30ng/ml IL-3 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) en medio completo RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino manteniendo la proporción de 10⁶ células/ml. Dos veces por semana se realizó recambio de medio durante 5 a 8 semanas.

5.1.2 Tinción para pureza del cultivo de BMMC

Se usaron 2x10⁵ células para la pureza del cultivo y se determinó mediante anticuerpos anti CD117-PerCP (clona 2B8) (BioLegend, California, USA) y anti FcεRI-Alexa Fluor 647 (clona MAR-1) (BioLegend). Las células fueron re-suspendidas en SFB 2% en PBS y teñidas por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente las células fueron lavadas con SFB 2% en PBS. Se adquirieron 10 000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience, California, USA) y los eventos se analizaron con el software FlowJo Versión 8.7.

5.2 Leptina recombinante murina

La leptina recombinante (PeproTech, New Jersey, USA) se mantuvo a -20°C hasta que se reconstituyó en agua inyectable estéril con 0.1% de albumina sérica bovina como lo indica el inserto. Para evitar ciclos de congelación y descongelación se hicieron alícuotas que se mantienen a -20°C. Transcurridos los 3 meses de almacenaje en congelación una vez reconstituida, las alícuotas se desecharon.

5.3 Ácido valproico

El ácido valproico (Depakene® Lab. Abbott MC. Pherson) (VPA) fue obtenido de Hospira una compañía de Pfizer (Kansas, USA) Inc. en presentación de solución inyectable. Cada ampolleta contiene valproato de sodio equivalente a 500 mg de ácido valproico.

5.4 Viabilidad celular

Los BMMC fueron estimulados con diferentes concentraciones de VAP por 18 horas y como control positivo se dejaron 10 minutos a 56°C para inducir la muerte celular. Transcurrido el tiempo correspondiente las células se tiñeron siguiendo las instrucciones del fabricante con 1µl de Anexina V marcada con APC (BioLegend) por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron y se les adiciono 0.5 µl de yoduro de propidio (eBioscience, Affymetrix, Inc., California, Estados Unidos) Inmediatamente se adquirieron 10 000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience) y los eventos se analizaron con el software FlowJo Versión 8.7. Se consideraron células viables, aquellas que fueron negativas para ambos marcadores.

5.5 Evaluación de la desgranulación por leptina

El proceso de desgranulación se evaluó con el anticuerpo anti CD107a/PE (LAMP-1); como se describió previamente (A. Nieto-Patlán et al. 2015). CD107a se expone en la superficie de la célula cuando ocurre la desgranulación. Se colocaron 2×10^5 BMMC en medio RPMI suplementado con SFB 2% en tubos de poliestireno de 5ml con fondo redondo. Las células se estimularon con diferentes concentraciones de leptina (1, 10, 50, 100 y 1000 ng/ml) durante 1 hora a 37°C. Para cada ensayo se usó el compuesto 48/80 (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) como testigo positivo. Posteriormente las células se tiñeron con el anticuerpo anti-CD107a-PE (Clona 1D4B)(BioLegend) y FcεRI-Alexa 647 (BioLegend), en una dilución 1:300, durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavaron y re-suspendieron con SFB 2% en PBS, se adquirieron inmediatamente. Un total de 10 000 eventos se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience) y los eventos se analizaron con el software FlowJo Versión 8.7.

5.6 Inducción de la desgranulación vía FcεR

BMMCs (1×10^6 /ml) fueron sensibilizadas por 18 h en medio libre de citocinas y a 37°C con 2 µg/ml IgE de ratón anti-TNP(clona MEA-36) (BioLegend). Durante la sensibilización con IgE, en los ensayos de leptina y VAP, se usaron diferentes concentraciones de leptina (1, 10, 50, 100 y 1000 ng/ml) y para VAP 1 y 2 mM.

Transcurrido el tiempo se retira mediante lavados el anticuerpo que no se acoplo a los receptores Fc y cualquier estímulo adicionado. Posteriormente se realizó la activación con las concentraciones que se indiquen de TNP-BSA (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) a 37°C durante 1 hora. Las células se tiñeron superficialmente con los anticuerpos para evaluar desgranulación anti-CD107a-PE (BioLegend) y FcεRI-Alexa 647 (BioLegend) en una dilución 1:300, durante 20 minutos a 4°C. Las células se lavaron con SFB 2% en PBS. Se adquirieron 10 000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience) y los eventos se analizaron con el software FlowJo Versión 8.7.

5.7 Análisis de FcεRI, CD117, CD45 y CD44 en superficie

Los BMMC fueron estimulados con VAP 1 mM en medio sin citocinas durante los tiempos que se indiquen para cada figura. Posteriormente fueron lavados con PBS y centrifugados 1500 rpm 5 minutos. Transcurrido el tiempo se usaron los anticuerpos: anti FcεRI- Alexa Fluor 647 (BioLegend), CD45- FITC (Clona: 30-F11)(BD Biosciences), CD44- FITC (Clona: IM7)(eBioscience) y CD117-PerCP (BioLegend). Las células fueron teñidas por 20 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar se lavaron las células con SFB 2% en PBS. Se adquirieron 10 000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience) y los eventos se analizaron con el software FlowJo Versión 8.7. Se reporta la MFI para cada molécula.

5.8 Cuantificación de citocinas

Se obtuvieron los sobrenadantes a partir del cultivo de 2×10^5 BMMC, que se estimularon con 1, 10, 50, 100 y 1000 ng/ml de leptina durante 24 horas. También se recolectaron sobrenadantes de las BMMC que fueron sensibilizados con IgE en presencia de leptina o VAP y activados con TNP-BSA a los tiempos indicados. Los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -20°C hasta su uso. La

cuantificación se realizó mediante la técnica de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo de reactivos. Las citocinas cuantificadas fueron: TNF- α (BD Bioscience), IL-6 (BD Bioscience), IL-13(eBioscience).

5.9 Determinación de proteínas fosforiladas

Los BMMCs previamente sensibilizadas con IgE e incubadas con o sin VAP 1mM por 18 horas, fueron estimulados con TNP-BSA. Transcurridos 10 minutos para p38 o 5 minutos para el resto de las proteínas, las células se fijaron con PFA al 4.2% durante 10 minutos a 37°C. Las células se permeabilizaron con la solución comercial Perm Buffer III (BD Biosciences) o Perm Buffer IV (BD Biosciences, USA) para p38. Los anticuerpos empleados fueron anti-ERK1/2-PE (clona 20A), anti-Syk-PE (clona I120-722), anti-PLC- γ 2-Alexa Fluor 647 (clona K86-689.37), anti-Akt-Alexa Fluor 647 (clona M89-61), anti-p38-PE (clona 36/p38) (todos de BD Biosciences), de manera simultáneamente se incluyeron los controles de isotipo correspondientes: Alexa Fluor 647 IgG1, k. (clona MOPC-31C) y PE IgG1, k Isotype (clona MOPC-21) (BD Biosciences). Las células fueron re-suspendidas en buffer de tinción (BD Biosciences) y teñidas por 20 minutos en frío. Posteriormente las células se lavaron y re-suspendieron en buffer de tinción. Se adquirieron 10 000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur y los eventos se analizaron con el software FlowJo Versión 8.7. Los datos se representan como Intensidad Media de Fluorescencia (MFI).

5.10 Análisis estadístico

Los resultados son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. Las pruebas empleadas fueron: análisis de variancia unifactorial (ANOVA) seguida por la prueba post-test de Dunnett en el caso de comparación con el control y post-test de Bonferroni para la comparación entre grupos. En el caso de la comparación de la expresión de moléculas de superficie se uso *t-student* no pareado. Para datos no paramétricos como el de desgranulación normalizado, se utilizó la Prueba de Mann-Whitney. Se consideró una diferencia estadística significativa cuando el valor de $p < 0.05$ Los análisis se realizaron con el Software GraphPad Prism versión 5.

6 RESULTADOS

6.1 Determinación de la pureza de los cultivos de BMDC

Se evaluó la pureza de los cultivos de BMDC mediante citometría de flujo. Se usaron los marcadores FcεR1 y CD117 como referencia de pureza ya que son característicos de los mastocitos. A partir del mapa de puntos de tamaño contra granularidad, se excluyeron los detritos celulares. Se analizó el porcentaje de células que presentaban marcaje de dobles positivos (FcεR1+CD117+). Los cultivos usados en los siguientes ensayos presentaron más del 90% de eventos doble positivos (Figura 2D).

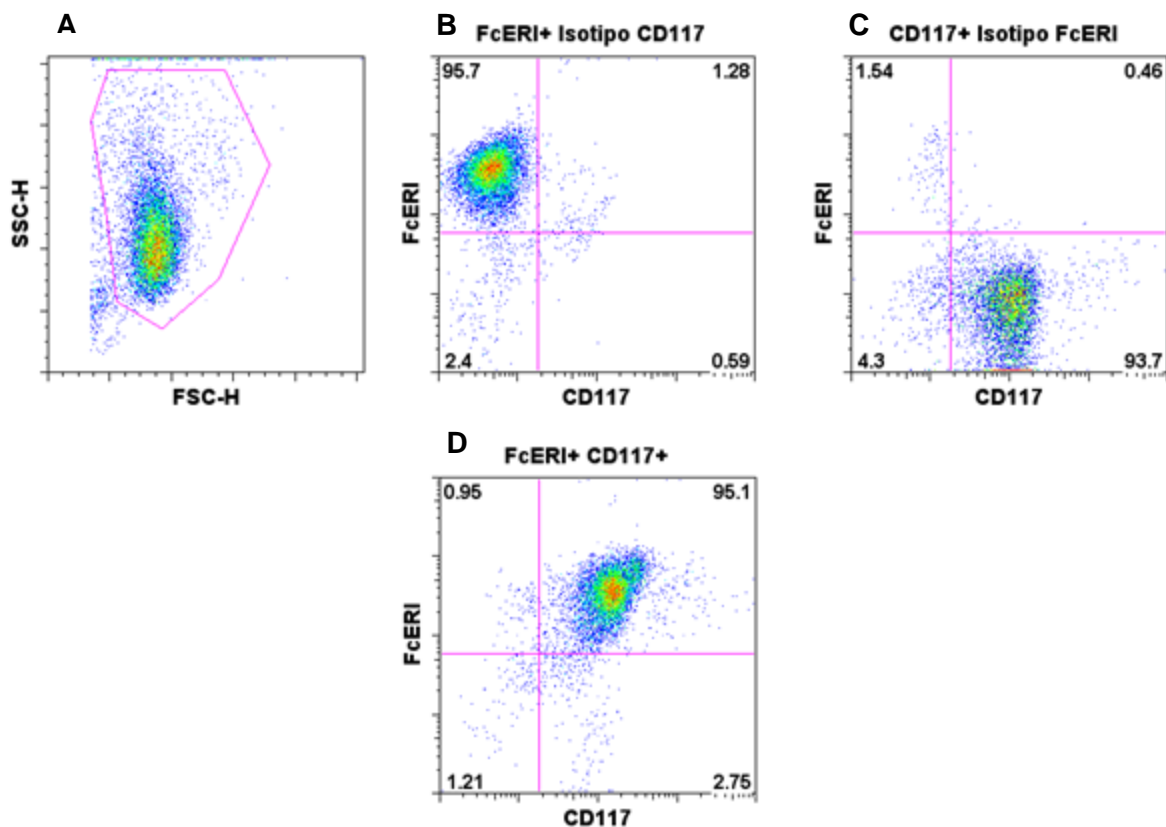


Figura 2. Estrategia de análisis para la determinación de la pureza de los cultivos de BMDC. Se tiñeron BMDC con anticuerpos específicos **A)** se seleccionó la región de acuerdo al tamaño (FSC) y granularidad (SSC), excluyendo detritos. **B)** tinción superficial de anti FcεR1-Alexa 647 y el control de isotipo-PerCp. **C)** tinción superficial anti CD117-PerCP y el control de isotipo-Alexa647. A partir de las tinciones sencillas se determinaron **D)** células FcεR1+CD117+, se obtuvo una pureza mayor al 90%. Imagen representativa de diferentes cultivos de BMDC.

6.2 Ensayo de desgranulación de mastocitos con leptina

El efecto de las diferentes concentraciones de leptina sobre la desgranulación, se evaluó mediante expresión de CD107a (LAMP-1) en la superficie de las células posterior al estímulo. Al incubar durante una hora las células, la leptina no genera cambios en la expresión de CD107a en comparación con las células no estimuladas (Figura 3B y 3C), sugiriendo que la leptina no induce la desgranulación de los BMMC.

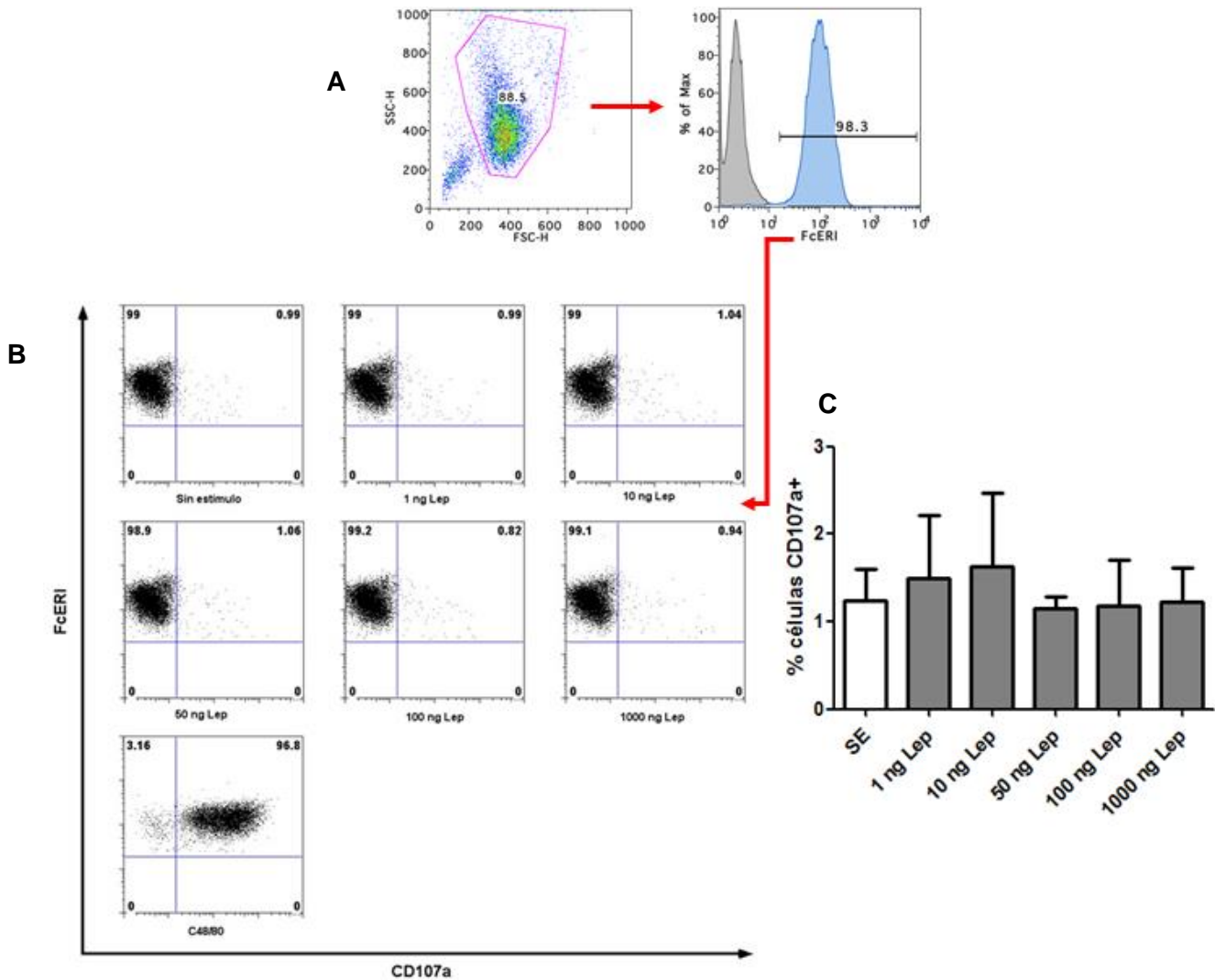


Figura 3. La leptina no induce desgranulación de BMMC. Los BMMC se estimularon con diferentes concentraciones de leptina. A) Se seleccionaron solo las células FcεRI+. **B)** Se determinó la expresión de CD107a (LAMP-1) en la superficie de las células estimuladas con leptina. Se incluye c48/80 como testigo positivo. Imagen representativa de 3 ensayos independientes. **C)** No se encontró diferencia en el porcentaje de células CD107a+. Los datos se graficaron como media±DS (n=3).

6.3 Leptina no induce la producción de citocinas en BMMC

Se evaluó si la leptina inducía la producción de IL-6 y TNF- α en BMMC a diferentes tiempos (Figura 4A y 4B). No se encontró diferencias entre los BMMC estimulados con leptina y las células sin estímulo, por lo que la leptina de manera directa no induce la liberación de TNF- α o IL-6.

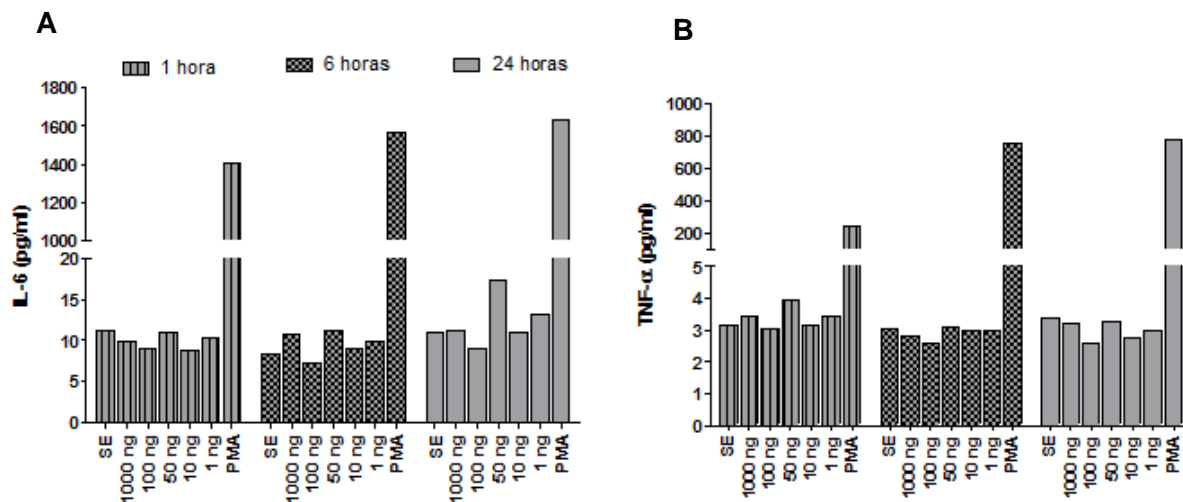


Figura 4. La leptina no induce producción de IL-6 o TNF- α . Los cultivos de se estimularon con diferentes concentraciones de leptina a los tiempos indicados. **A)** El estímulo con leptina en los mastocitos no induce la liberación de IL-6, de igual forma **B)** No hay liberación de TNF α al estímulo con leptina. La detección de las citocinas se hizo a partir de los sobrenadantes del cultivo celular mediante ELISA. Como testigo positivo se usó PMA 125ng/ml. Se muestran imágenes representativas de 2 dos ensayos independientes.

6.4 Activación de BMMC vía receptor Fc ϵ

Al no haber desgranulación o producción de citocinas en mastocitos estimulados con leptina, se analizó si la activación clásica vía Fc ϵ RI se veía afectada en presencia de leptina. Primeramente se estableció el modelo de desgranulación usando diferentes concentraciones de TNP-BSA. Se consideraron solo las células que fueran Fc ϵ RI+ de la población total (Figura 5A). Se encontró que a una hora de estímulo, la concentración de 50 ng/ml y 100 ng/ml de TNP-BSA generan un porcentaje mayor de células que expresan CD107a en superficie (Figura 5B), es decir mayor desgranulación.

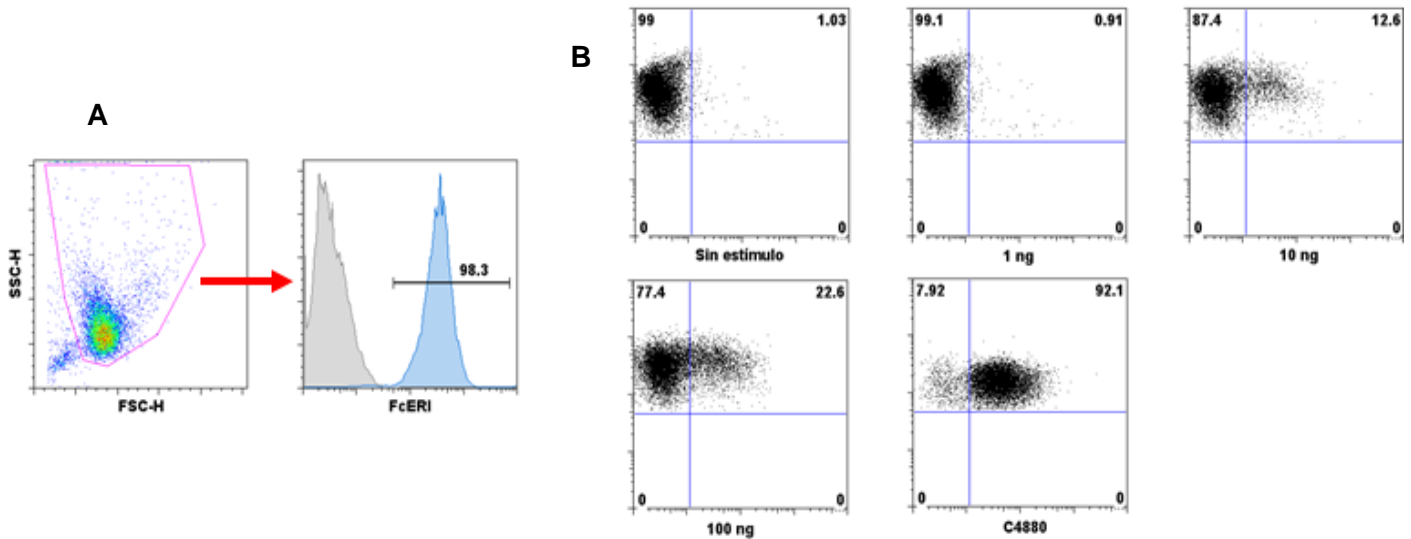


Figura 5. Desgranulación de mastocitos inducida vía receptor Fcε. BMNC fueron sensibilizadas con IgE y estimuladas por 1 hora con diferentes concentraciones de TNP-BSA. **A)** Del gráfico de tamaño contra complejidad se selecciono la población que fuera FcεRI+. **B)** evaluó la expresión de CD107a en superficie de los mastocitos. Se muestran gráficas de puntos y los porcentajes de expresión de CD107a. Testigo positivo compuesto 48/80 (C48/80).

6.5 La leptina no afecta la desgranulación de BMNC al estímulo vía FcεRI

Se estableció modelo de desgranulación dependiente del Fc, se procedió a evaluar si la leptina afectaba la desgranulación vía FcεRI. Las BMNC se incubaron con diferentes concentraciones de leptina, 18 horas antes del estímulo con TNP-BSA. Se utilizaron diferentes concentraciones de TNP-BSA para encontrar la concentración adecuada que generara la activación.

Se encontró que la concentración de 100ng de TNP-BSA genera una mayor desgranulación en comparación con las demás concentraciones (Figura 6)

Respecto a la leptina, existe una tendencia a que las diferentes concentraciones indujeran una mayor desgranulación en comparación con las células que no se pre incubaron con leptina (Figura 6).

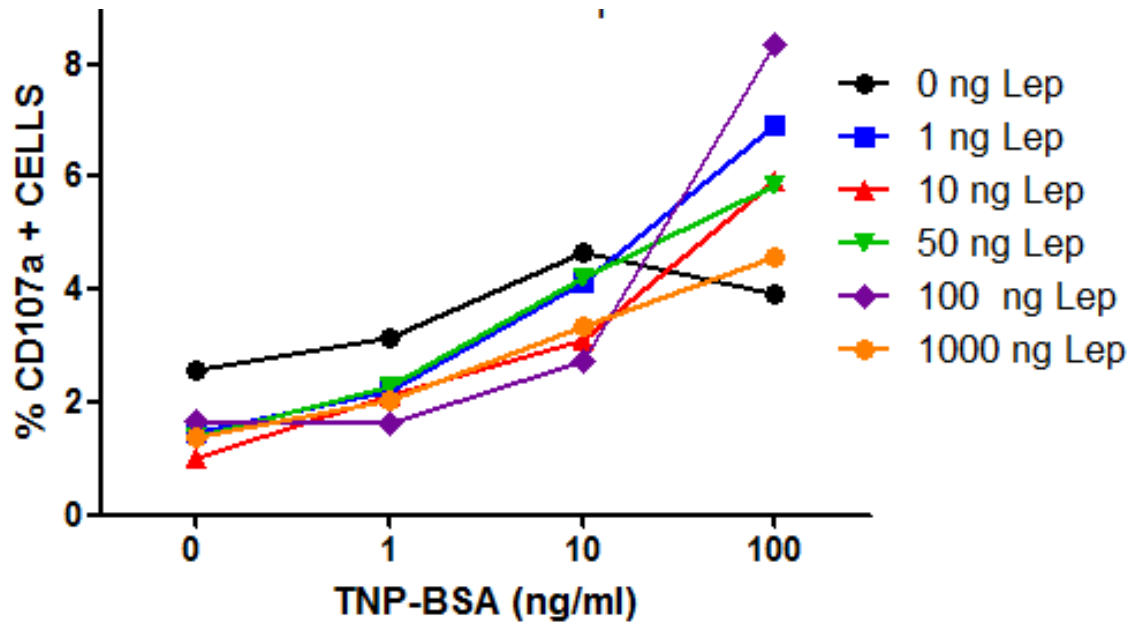


Figura 6. La desgranulación de mastocitos via FcεRI en presencia de leptina. BMDC fueron pre-incubados con diferentes concentraciones de leptina (Lep), sensibilizados con IgE anti TNP y estimulados por 1 hora con las concentraciones que se indican de TNP-BSA. La desgranulación se representa con el porcentaje de expresión de CD107a en la superficie celular. Imagen de un único ensayo.

Los ensayos anteriores permitieron definir la concentración adecuada de estímulo para inducir la desgranulación. Poder definir si había modificación de la desgranulación en las células tratadas con leptina se seleccionó 100 ng/ml de TNP-BSA para el resto de los experimentos. Al analizar en varios cultivos independientes de BMDC las diferentes concentraciones de leptina, se encontró una tendencia en la que la leptina induce una mayor desgranulación (Figura 7A) comparando con los valores de desgranulación obtenidos de células que durante la sensibilización estuvieron con solo medio, sin embargo, no hay diferencia significativa (Figura 7B).

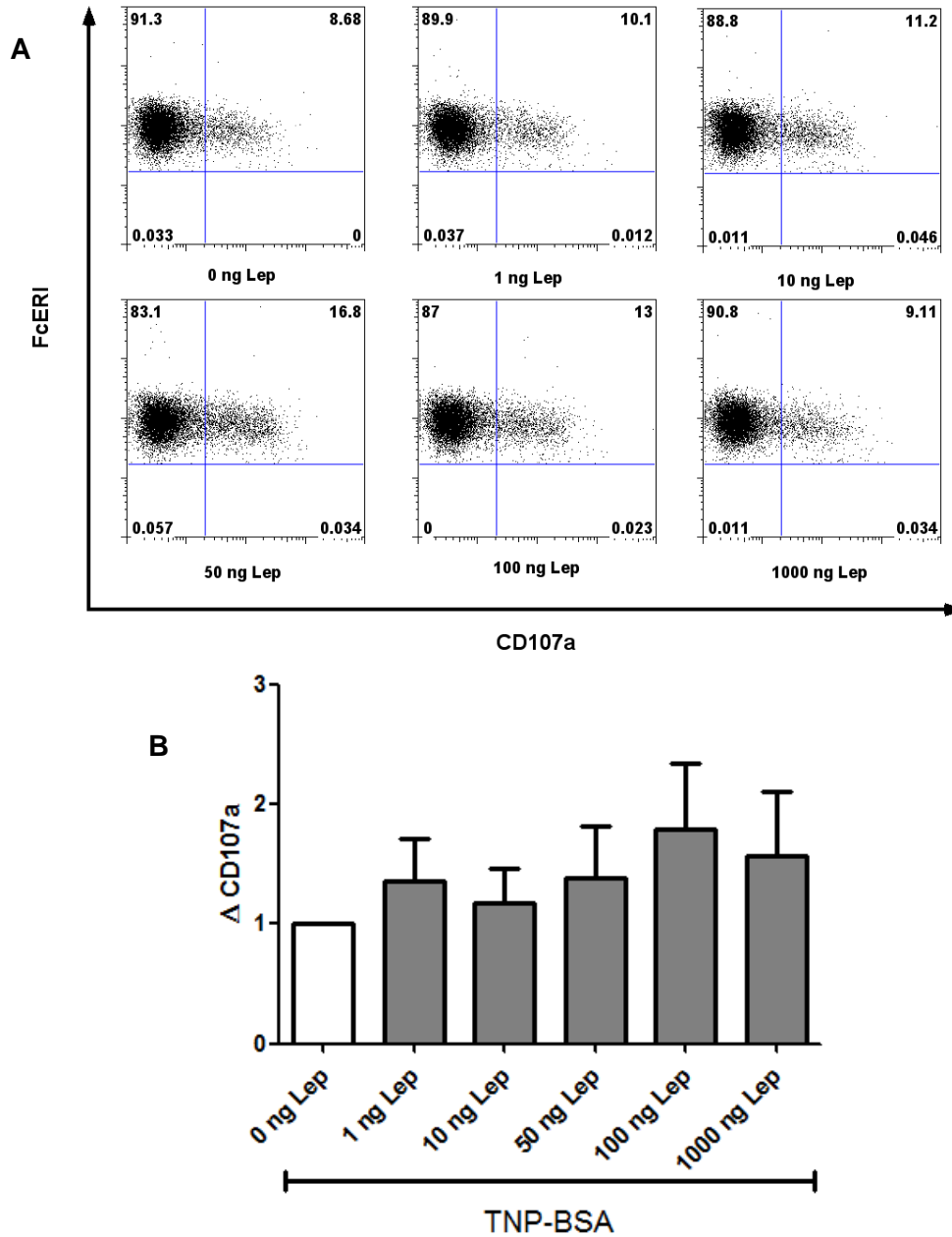


Figura 7. La leptina no incrementa la desgranulación de BMMCs al entrecruzamiento del FcεRI. Las células se sensibilizaron con IgE anti TNP en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de leptina por 18 horas. Posteriormente se indujo el entrecruzamiento con 100 ng/ml de TNP-BSA durante 1 hora. **A)** Imagen representativa de los diagrama de contornos de BMMCs, seleccionando la región de células FcεRI⁺. Se muestran el porcentaje de células CD107a⁺. **B)** Normalización de la desgranulación de BMMC con base a los porcentajes de células CD107a⁺ que no estuvieron en presencia de leptina (0 ng Lep). Los datos se expresan como media±DS El análisis estadístico se hizo usando ANOVA de una vía, seguido de una comparación múltiple de Dunnett. De 4 cultivos independientes..

Para comprobar que la leptina no alteraba la expresión del receptor Fcε en la superficie celular y esto estuviera asociado a la desgranulación, se evaluó la intensidad media de fluorescencia (MFI). Se encontró que la leptina no afecta la expresión del FcεRI en los BMMCs (Figura 8).

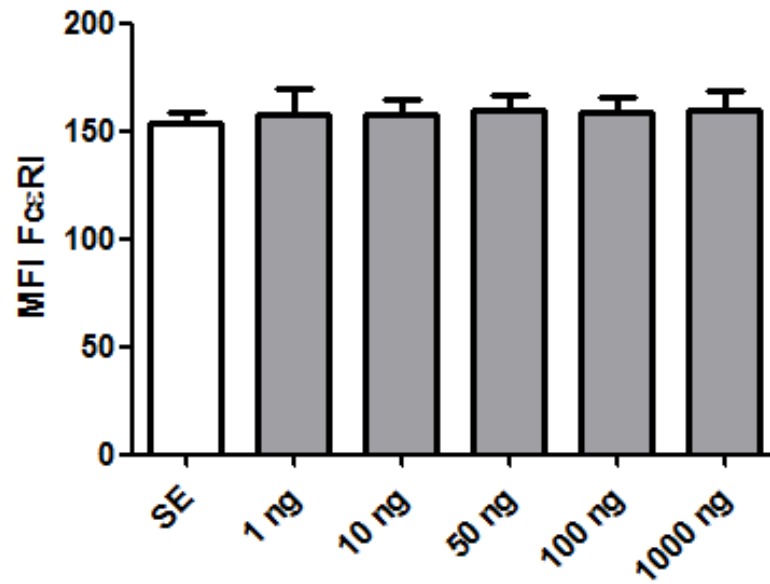


Figura 8. La leptina no afecta la expresión del receptor FcεRI en los mastocitos. Los cultivos de BMMC IL-3 fueron estimulados con diferentes concentraciones de Leptina durante 18 horas y se muestra la MFI del receptor FcεRI. Ensayo de 4 cultivos independientes.

Se ha reportado que al estimular a los mastocitos vía el receptor Fcε, además de generar desgranulación, se activan vías de señalización involucradas en la síntesis de citocinas como TNF-α e IL-6. (Föger *et al.* 2011). Por lo que se evaluó la liberación de IL-6, TNF-α e IL-13 en BMMC pre incubados con leptina, sensibilizados con IgE y estimulados con TNP-BSA. Al evaluar las citonas, no se encontró una diferencia en la producción de TNF-α (Figura 9A), IL-6 (Figura 9B) o IL-13 (Figura 9C) en el grupo estimulado con la leptina comparado respecto al grupo sin leptina. Los resultados obtenidos hasta el momento nos indican que la leptina no modifica la activación clásica vía FcεRI de los mastocitos.

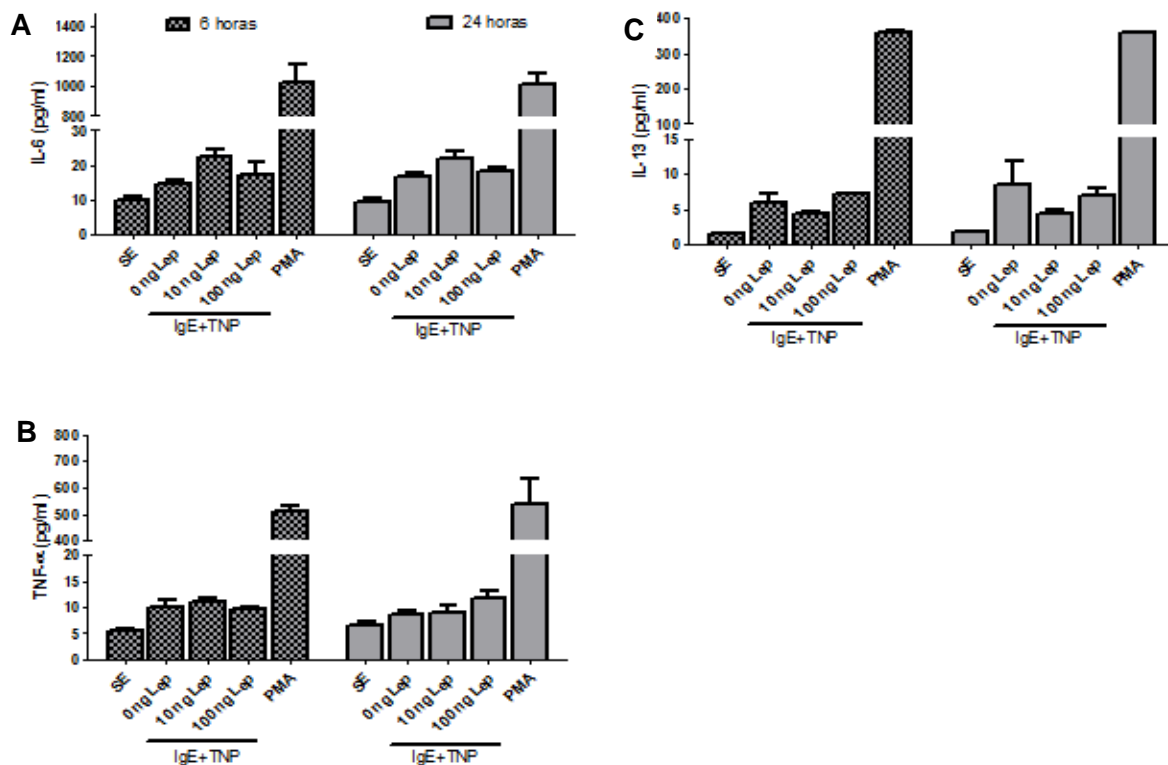


Figura 9. La presencia de leptina no afecta la producción de citocinas al estimular vía FcεRI. Los BMMC se sensibilizaron con IgE anti TNP-BSA sin leptina y con leptina (10 ng y 100 ng) por 18 horas. La desgranulación se indujo con TNP-BSA (100 ng/ml). Se evaluó la producción de **A)** IL-6, **B)** TNF-α e **C)** IL-13 en el sobrenadante por ELISA a los tiempos indicados. SE: sin estímulo. Imagen de un solo ensayo por triplicado.

6.6 Viabilidad de BMMC en presencia de VAP

Previo a evaluar si el VAP tiene una actividad inmunomoduladora en los mastocitos, se buscó la dosis óptima que no generase muerte celular. Ya que se ha reportado que el VAP puede inducir apoptosis (Gottlicher et al. 2001). Lyberg y colaboradores demostraron que en la línea celular de mastocitos humanos HMC1.2 el VAP en concentraciones mayores a 5mM afecta la viabilidad a partir de las 24 horas (Lyberg et al. 2017). Al evaluar diferentes concentraciones de VAP en los BMMC, se encontró que las concentraciones superiores a 5 mM de VAP por 18 horas afectan la viabilidad de las células. Las concentraciones de 1 y 2 mM no tienen un efecto marcado en la viabilidad de los mastocitos (Figura 10). Con base en esto se

seleccionaron las concentraciones de 1 y 2mM por 18 horas para evaluar que efecto tiene el VAP en la respuesta vía FcERI.

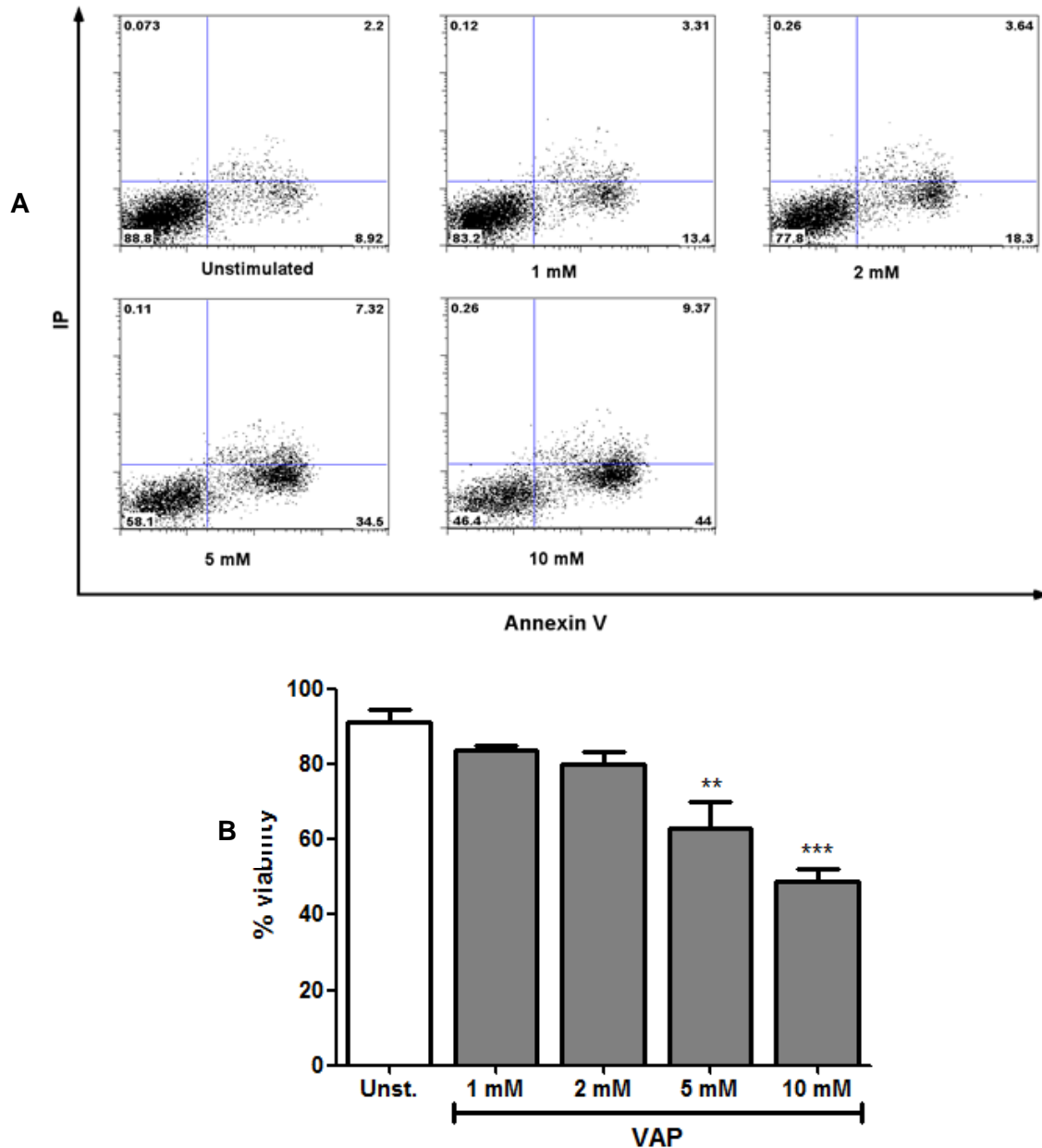


Figura 10. La viabilidad de los BMDC no se afecta en dosis bajas de ácido valproico. Los BMDC estuvieron en presencia de ácido valproico (VAP) a diferentes concentraciones o solo con medio (Unst.) durante 24 h. Las células se tiñeron con Anexina V-FITC y yoduro de propidio, posteriormente se analizaron por citometría de flujo. **A)** Las BMDC viables son las células que fueron dobles negativas para el marcaje. **B)** Los datos se representan como la media \pm SD de dos cultivos independientes. El análisis estadístico se hizo usando ANOVA de una vía, seguido de una comparación múltiple de Dunnett. **P < 0.01, ***P < 0.001

6.7 El VAP disminuye la desgranulación en mastocitos dependiente de IgE

La modulación del mastocitos durante la anafilaxia en respuesta a un alérgeno, podría ser clave para el desarrollo de nuevas terapias. Por lo que se evaluó el efecto del VAP en la activación clásica dependiente de IgE en los mastocitos. Los mastocitos fueron tratados con VAP durante el periodo de sensibilización con IgE anti-TNP, posteriormente retados con TNP-BSA. Al inducir la desgranulación, evaluando la expresión de CD107a en superficie, se encontró que en las células pre tratadas con VAP había menor desgranulación en comparación con el grupo sin fármaco (Figura 11A y 11C). Para evaluar si el VAP afectaba también la desgranulación independiente del FcεRI e IgE, se usó el compuesto 48/80 (C48/80) un inductor ampliamente usado para desgranulación. El C48/80, es reconocido por el receptor MRGPRX2, que es un receptor acoplado a proteínas G. Tras activarse hay liberación de calcio intracelular, lo que induce la desgranulación (Porebski et al. 2018). Se encontró que la pre-incubación con VAP no afecta la desgranulación inducida por C48/80 (Figura 11B y 11D), al no encontrarse una diferencia en la expresión de CD107a en comparación con las células sin VAP. Lo que sugiere que el VAP actúa de manera selectiva en la desgranulación.

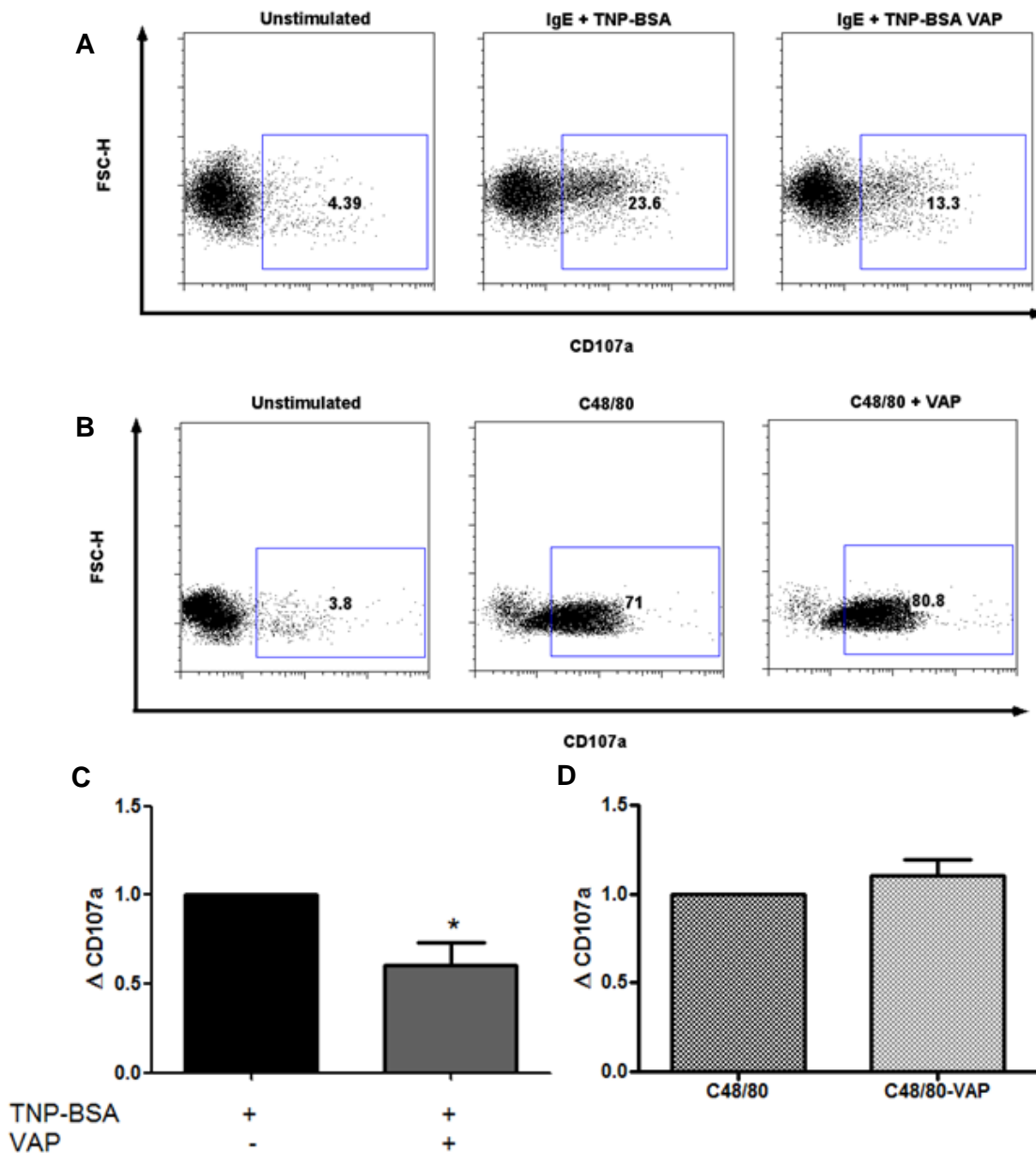


Figura 11. El VAP disminuye la desgranulación de mastocitos inducida vía Fc ϵ RI. Los BMDC estuvieron en presencia 1 mM de VAP durante 18 h. Posteriormente se les indujo la desgranulación con **A)** TNP-BSA o **B)** C48/80. Se evaluó la expresión de CD107a por citometría de flujo y los datos de la desgranulación de BMDC, se normalizaron con base a los porcentajes de células CD107a+ que no estuvieron en presencia de VAP para **C)** TNP-BSA y **D)** C48/80 de 4 cultivos independientes. Para la comparación de los grupos se usó una prueba de Mann-Whitney * $p < 0.05$.

6.8 El VAP disminuye la producción de $TNF\alpha$, IL-6 e IL-13 al estímulo vía Fc ϵ RI

Una vez que se determinó que el VAP disminuye la desgranulación dependiente de IgE, se evaluó si la producción de citocinas también se veía afectada. Se encontró que el tratamiento con VAP disminuía la producción de IL-6, TNF, IL-13 (Figura 12 A-C) reduciendo de manera significativa a las 24 horas. Esto sugiere que el VAP también afecta la producción de ciertas citocinas. Para el caso de IL-4 (Figura 12D) no se indujo la producción de esta citocina a través del estímulo con Fc ϵ RI, por lo que no se puede concluir si hay modulación por parte del VAP.

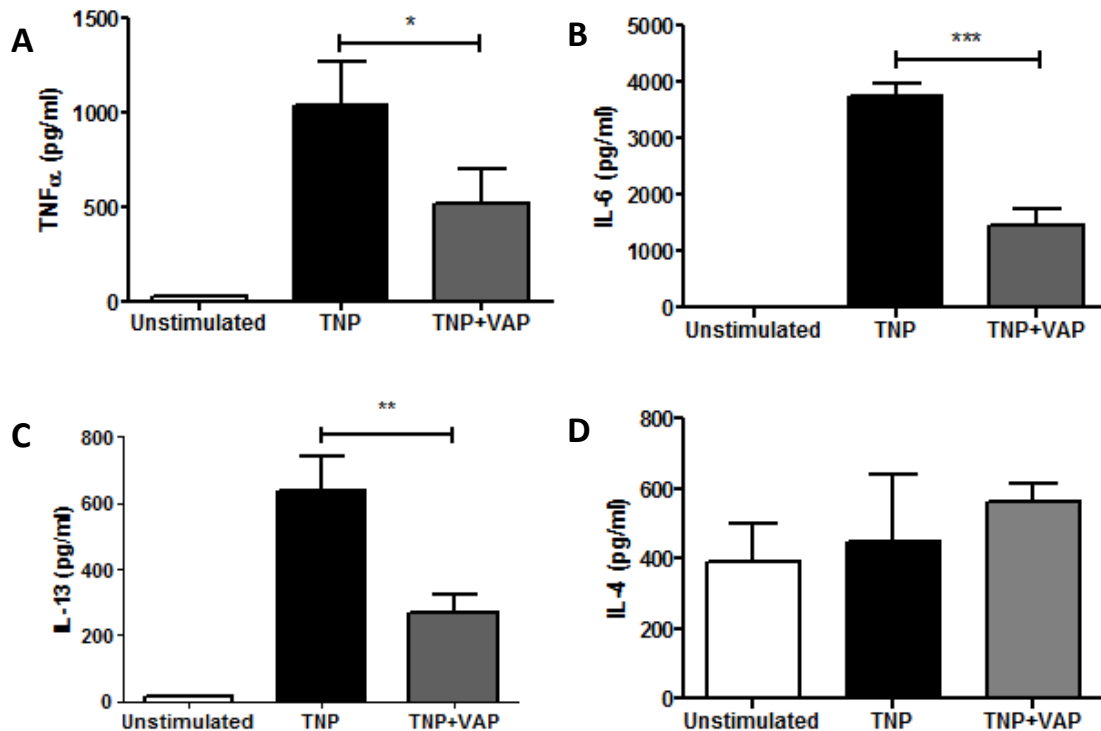


Figura 12. El VAP disminuye la producción de citocinas dependiente de la vía Fc ϵ RI-IgE. Los BMMC se sensibilizaron con IgE anti-TNP en ausencia o presencia de VAP a 2 mM por 18 horas. La desgranulación se indujo con TNP-BSA y los sobrenadantes se colectaron a las 24 horas. **A)** TNF, **B)** IL-6, **C)** IL-13 **D)** IL-4. Los datos se muestran como media \pm SD de tres cultivos independientes. Para el análisis estadístico se usó una ANOVA seguido de una comparación múltiple de Bonferroni comparando el grupo TNP con y sin VAP. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6.9 Efecto del VAP en moléculas de superficie

6.9.1 El VAP afecta la expresión de FcεRI y CD117 en mastocitos

Ya que el VAP disminuía la desgranulación y la síntesis de *ново* de las citocinas, se analizó si la expresión del FcεRI inicial estaba afectada. Cuando se evaluó la intensidad media de fluorescencia, por citometría de flujo, las células que se incubaron con VAP por 24 horas presentaban menor expresión del FcεRI (Figura 13D). Para discernir si era un efecto que solo afectara al receptor FcεRI, se analizaron otras moléculas en la superficie de los mastocitos. Se encontró que CD117 (Figura 13C) también disminuía, sin embargo, CD45 y CD44 (Figura 13 A-B) no eran afectadas por el VAP. Por lo que estos resultados demuestran que el VAP afecta de manera selectiva la expresión de moléculas que participan en la activación del mastocito.

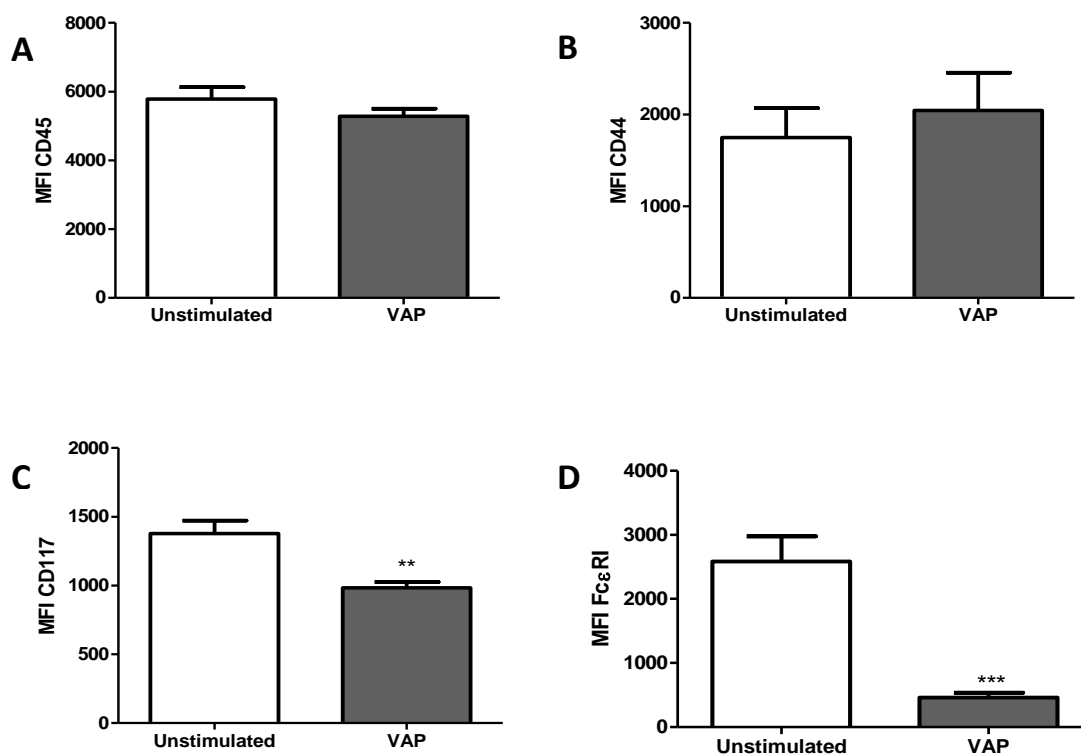


Figura 13. El VAP disminuye la expresión de FcεRI y CD117 en los mastocitos. Los BMNC estuvieron en presencia o ausencia (Unstimulated) de VAP 1 mM durante 24 h. Para evaluar la expresión de **A)** CD45, **B)** CD44, **C)** CD117 y **D)** FcεRI, se usaron anticuerpos específicos y se analizó por citometría. Se muestran los diferentes marcadores con su MFI. Los datos se representan como la media ± SD de tres cultivos independientes. *t-student* no pareado, *** p < 0.001, ** p < 0.01.

6.9.2 La disminución del FcεRI inducida por VAP depende del tiempo

En líneas celulares, se ha reportado que la modificación en la expresión de moléculas de superficie por el VAP es dependiente del tiempo (Armeanu et al. 2005). Al analizar si el efecto del VAP sobre el receptor FcεRI dependía también del tiempo de incubación, se encontró que la disminución del FcεRI ocurre desde las 6 horas y continúa disminuyendo hasta las 20 horas (Figura 14). Lo que sugiere que el efecto del VAP en la desgranulación dependiente de IgE en los mastocitos, está asociado a una pobre unión de la IgE.

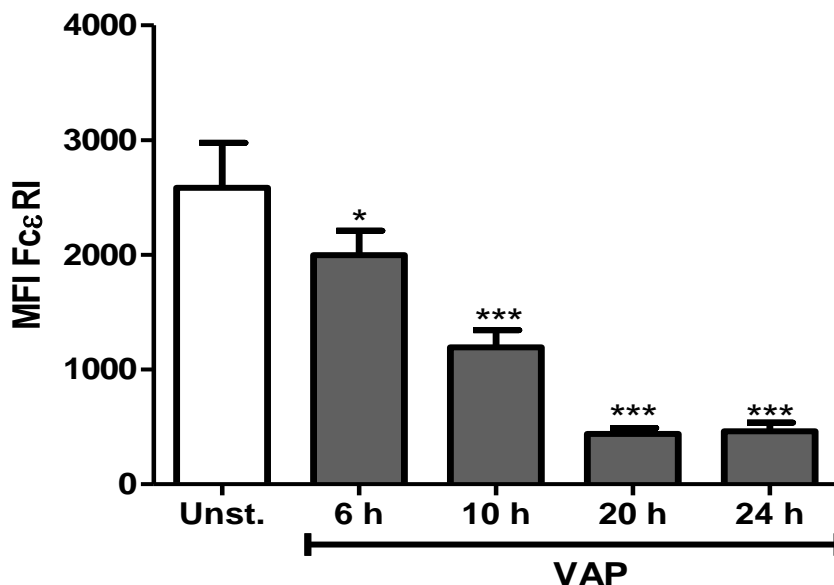


Figura 14. La disminución en la expresión del receptor Fcε en los mastocitos por el VAP es dependiente del tiempo. Los BMMC fueron sensibilizados con IgE durante 18 horas en presencia (1 mM) o ausencia de VAP. Se les indujo desgranulación con TNP-BSA y se evaluó por citometría de flujo la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) del FcεRI en superficie. Unst.: sin estímulo. Los datos son expresados como la media \pm SD del análisis de tres cultivos independientes de BMMC. ANOVA de una vía, seguido de una comparación múltiple de Dunnett . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6.10 Efecto del VAP en la fosforilación de moléculas clave en la señalización del FcεRI

Ya que el receptor Fcε presentaba una baja expresión en la superficie de los mastocitos, se evaluó si la vía de señalización dependiente de este se encontraba afectada por el VAP. Una de las primeras moléculas en activarse y fosforilarse una vez que se lleva a cabo el entrecruzamiento del FcεRI es la tirosincinasa Syk. Sorpresivamente, los mastocitos expuestos al VAP y activados a través del FcεRI mostraron niveles similares en la MIF de Syk fosforilada, en comparación con mastocitos activados en ausencia de VAP (Figura 15A), indicando que la disminución en la expresión de FcεRI no alteraba el inicio de la señalización.

Ya que no se encontraron diferencias en la activación de Syk se realizó una caracterización más completa del resto de las moléculas involucradas en la vía de señalización del FcεRI. Cuando se analizó la fosforilación de ERK 1/2 y p38, moléculas pertenecientes a la vía de MAP cinasas, no se encontraron diferencias significativas entre los mastocitos tratados con VAP o sin tratamiento (Figura 15 B-C).

La serin/treonina cinasa Akt representa otra molécula clave en la señalización a través del FcεRI. Cuando se evaluó su nivel de fosforilación en los BMCC activados en presencia de VAP se observaron niveles similares a los de BMCC que no fueron expuestos a VAP (Figura 15D).

Finalmente la PLCγ desempeña otra ruta de señalización que se activa durante el entrecruzamiento del FcεRI. Una de las isoformas de PLCγ, que permite la conversión de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (IP2) en inositol trifosfato (IP3) y diacil glicerol fundamental para la movilización de calcio intracelular y extracelular. Los BMCC expuestos a VAP mostraron menores niveles de PLCγ2 fosforilado (Figura 15E) en comparación a los BMCC que no fueron expuestos. Estos resultados muestran que el VAP no altera todas las rutas de señalización inducidas por la activación del FcεRI, pero en particular afecta la vía de PLCγ.

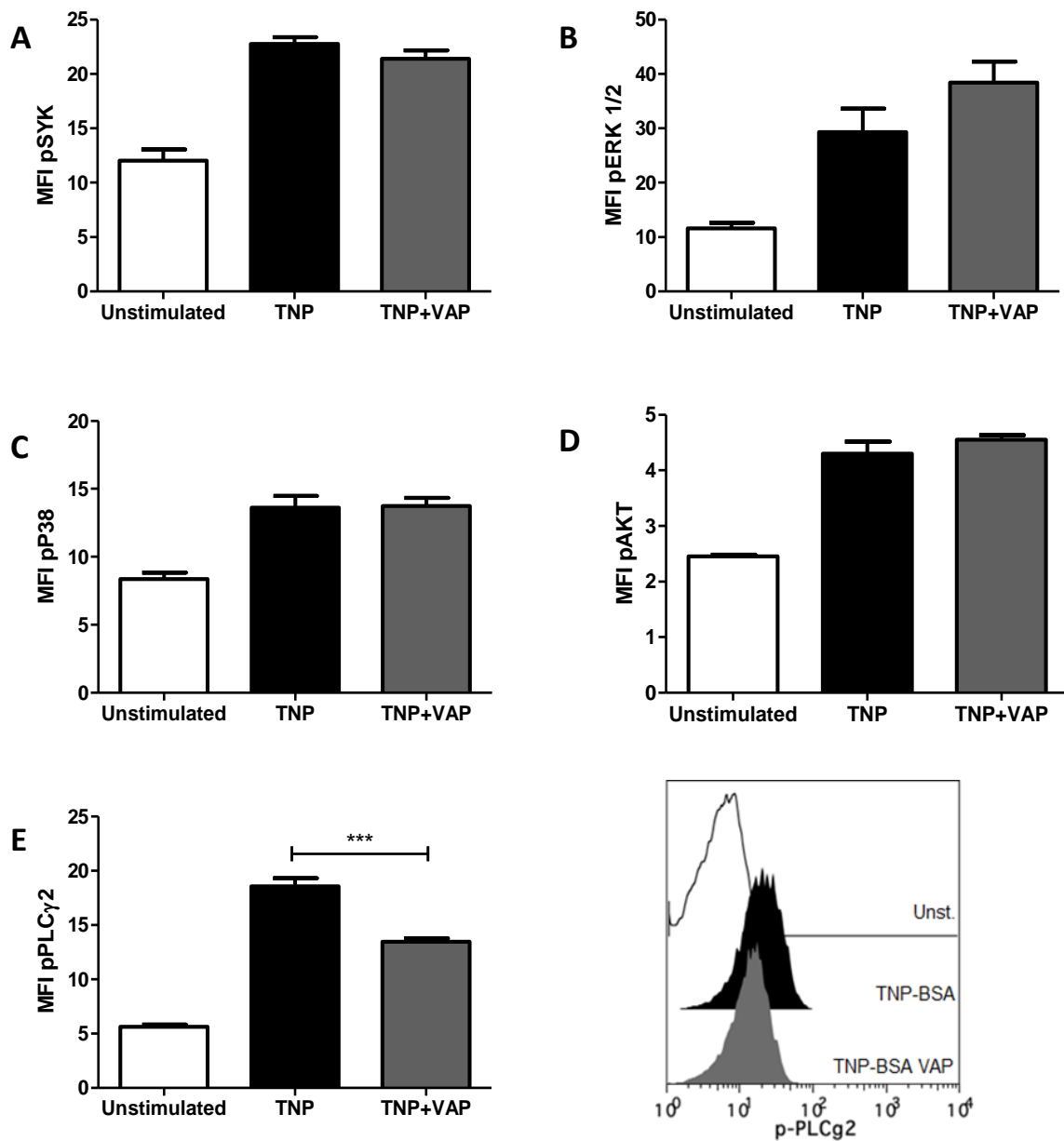


Figura 15. El VAP disminuye pPLCγ2. Los BMMC se sensibilizaron con IgE anti TNP en ausencia o presencia de VAP a 1 mM por 18 horas. La desgranulación se indujo con TNP-BSA (100 ng/ml). Se evaluó la fosforilación de **A)** SYK, **B)** ERK 1/2, **C)** p38 **D)** AKT y **E)** PLCγ2 y tras la activación, por citometría de flujo. Los datos se muestran como media ± SD de tres cultivos independientes. Para el análisis estadístico se usó ANOVA de una vía seguido de una comparación múltiple de Bonferroni. ***p < 0.001.

7 DISCUSIÓN

Los mastocitos son células de respuesta rápida, ya que al activarse y desgranular pueden liberar gran variedad de mediadores preformados que almacenan en sus gránulos. Este proceso es seguido de la síntesis de *novo* de factores que favorecen la inflamación. Los mastocitos, al tener una ubicación próxima a vasos sanguíneos, pueden regular la permeabilidad y flujo vascular, favoreciendo el infiltrado inflamatorio como ocurre en los procesos de anafilaxis (Kunder, St John, and Abraham 2011). La desgranulación que depende de IgE y el receptor Fcε ha sido ampliamente estudiada por sus implicaciones fisiopatológicas. La modulación de esta respuesta ya sea limitando la acción de los productos pro inflamatorios o disminuyendo la activación de los mastocitos permitirá proponer nuevos tratamientos profilácticos (Theoharides *et al.* 2007).

Existen diversas moléculas con orígenes diferentes que pueden modular la respuesta inmune. El ambiente en que el que se encuentre un mastocito es crucial para la respuesta que se dará. Se ha demostrado que la IgE acoplado al FcεRI al reconocer el antígeno actúa de manera sinérgica con ligandos de TLR2 y TLR4, potenciando la producción de citocinas (Qiao *et al.* 2006). Citocinas como el factor de células madres (SCF) ligando del receptor CD117 (c-kit) actúa de manera sinérgica con el FcεRI favoreciendo un incremento en la liberación de calcio y en consecuencia en la desgranulación (Hundley *et al.* 2004).

De igual manera se ha encontrado que ciertos fármacos como la tricostatina disminuye la respuesta mediada por IgE en los mastocitos afectando la desgranulación y la producción de citocinas dependientes de NF-κB (Krajewski *et al.* 2018).

Compuestos de origen natural encontrados en alimentos como el resveratrol y la curcumina han sido catalogados como potentes antiinflamatorios. Lo que ha sido demostrado en mastocitos regulando la activación y desgranulación dependiente del receptor FcεRI e inhibiendo las reacciones alérgicas mediadas por los mastocitos (Han *et al.* 2013; Kinney *et al.* 2015). Inclusive metabolitos bacterianos como el butirato pueden regular la respuesta de los mastocitos al antígeno,

disminuyendo la producción de citocinas sin afectar la desgranulación (Zhang et al. 2016). La combinación de señales y el proceso transcripcional generado pueden ser modificados por el ambiente favoreciendo o afectando la respuesta de los mastocitos a los antígenos.

En otras células asociadas al asma, como los neutrófilos y basófilos, se ha observado que la leptina favorece la supervivencia, induce la migración celular e incrementa la producción de citocinas (Zarkesh-Esfahani et al. 2004; Bruno et al. 2005; Suzukawa et al. 2011). La leptina además de actuar como un importante regulador del peso corporal, desempeña otras funciones biológicas como la regulación de la respuesta inmune (Ouchi et al. 2011). En el presente estudio se demostró que en los mastocitos, la leptina no induce desgranulación a diferencia de los basófilos (Suzukawa et al. 2011). Zarkesh-Esfahani y colaboradores reportaron que la leptina por sí sola puede inducir la producción de citocinas y desgranulación en mastocito de rata, sin embargo, en este trabajo no se encontró que el mastocito respondiera al estímulo con leptina. También se ha reportado que la leptina puede modular ciertas respuestas de manera indirecta (Zarkesh-Esfahani et al. 2004) y ya que se ha reportado un incremento de IgE en personas con asma y obesidad (Fitzpatrick, Joks, and Silverberg 2012) se evaluó si la leptina podría modificar la desgranulación dependiente de IgE.

Se encontró que los mastocitos derivados de médula ósea que estuvieron en contacto con leptina durante la sensibilización con IgE mostraron una tendencia a incrementar la desgranulación, sin embargo, no fue significativa. En tiempos tardíos, posterior a la desgranulación, también se liberan citocinas proinflamatorias (Stone, Prussin, and Metcalfe 2010). Al evaluar si la presencia de leptina inducía un cambio en la producción de IL-6 y TNF- α ., no se encontraron diferencias al comparar con el grupo sin leptina. Por lo que no podemos concluir si existe o no modulación por parte de la leptina en BMMC, se sugiere analizar con más detalle el papel de la leptina en mastocitos.

Por otra parte, existe un interés creciente del uso de inhibidores de las desacetilasas de histonas como tratamiento en enfermedades inflamatorias, como en el asma. En

un modelo de ratón sensibilizado y retado con ovoalbúmina, se demostró que la administración de VAP disminuye el engrosamiento de la pared bronquial y mejora la hiperreactividad bronquial en comparación los ratones no tratados (Royce et al. 2011). A partir de esta información se evaluó si el VAP tenía la capacidad de afectar la activación de los mastocitos vía FcεRI. Ya que no existen trabajos previos en mastocitos de medula ósea, se evaluó la citotoxicidad del compuesto en los cultivos *in vitro*. Se encontró que a concentraciones menores a 2 mM no afectan la viabilidad de las células. Generalmente para cultivos primarios en otras estirpes celulares de la respuesta inmune se usan generalmente concentraciones en el rango de 0.1 mM a 5 mM (Frikeche et al. 2012; Arbez et al. 2014; Bhat, Oberg, y Kabelitz 2015).

La desgranulación es un fenómeno que se presenta en diferentes estirpes celulares de la respuesta inmune. Estudios recientes han mostrado que el VAP afecta la desgranulación en células NK, afectando la expresión del receptor de activación NKG2D, lo que disminuye su capacidad citolítica (Ni et al. 2017). Si el VAP afecta la desgranulación en otras poblaciones celulares no es conocido hasta el momento. Sin embargo, en este trabajo se demuestra que el VAP disminuye la desgranulación inducida por el entrecruzamiento del FcεRI en mastocitos, al encontrar una menor expresión de CD107a en la superficie.

Además del proceso de desgranulación, el VAP fue capaz de disminuir la expresión de citocinas al activarse a través del FcεRI. En este trabajo se encontró que el VAP disminuía la producción de IL-6, TNFα, IL-13; sin embargo, no se observó la inducción de IL-4 en este sistema. El VAP tiene la capacidad de modular la producción de citocinas en otras células de la respuesta inmune disminuyendo las citocinas que dependen de NF-κB (Ichiyama et al. 2000).

Ya que el VAP tiene la capacidad de modular la expresión de receptores involucrados en la activación de células NK y dendríticas plasmacitoides (Ni et al. 2017; Arbez et al. 2014), en este trabajo se evaluó si el VPA afectaba la expresión del FcεRI. Se observó que el VPA disminuía la expresión del FcεRI de manera dependiente del tiempo de exposición. Además se observó que CD117, otra molécula importante en la activación de los mastocitos, también disminuía ante la

exposición al VAP. Sin embargo, otras moléculas como CD44 (molécula de adhesión) y CD45 (antígeno común leucocitario) no fueron afectadas en su expresión. Los mecanismos involucrados en esta disminución selectiva de los receptores de activación de los mastocitos necesita ser analizado con más detalle, pero una posibilidad es que el VAP favorezca su interiorización (Kitaura et al. 2004) o bien, que se afecte el proceso de la síntesis de estas proteínas, en cuyo caso se podría asociar a la capacidad del VAP como inhibidor de desacetilasas de histonas (Phiel et al. 2001).

Debido a que el VAP afectaba los niveles en membrana del Fc ϵ RI, se sospechó que la vía de señalización de este receptor probablemente estuviera afectada como ocurre en moléculas de activación de monocitos y células NK (Ni et al. 2017)(Ichiyama et al. 2000).

Una vez que la IgE que está unida a la subunidad α del Fc ϵ RI, reconoce al antígeno y este entrecruza, las cadenas γ y β permiten la señalización intracelular y la modulación de la respuesta respectivamente, esto a través de motivos de activación basado en tirosina (ITAM). Syk y Lyn son reclutadas entonces a los sitios ITAM, la activación de Syk permite la fosforilación de la molécula adaptadora LAT. Lo que resulta en la unión indirecta de otras moléculas adaptadoras, y la activación de PLC γ que resulta en la formación de inositol trifosfato y diacilglicerol, induce la elevación de calcio libre en el citosol y la activación PKC molécula asociada tanto a la desgranulación como la producción de citocinas. La vía que permite la liberación de citocinas es la de las protein cinasas activadas por mitógenos (MAPKS), que incluye ERK1/2, p38 y JNK que en respuesta activan AP1, NFAT y NF κ B. En esta vía participa AKT que permite la función de NF κ B (Gilfillan and Tkaczyk 2006)(Metcalf, Peavy, and Gilfillan 2009). En este proyecto se analizó parte de la vía de señalización de Fc ϵ RI se evaluó Syk ERK1/2, p38 y AKT, sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la fosforilación de estas moléculas en el tratamiento con VAP. Al analizar PLC γ 2, se evidenció la disminución de esta proteína fosforilada en las células tratadas con VAP. Lo anterior explica la disminución en desgranulación, ya que la deficiencia de PLC γ 2 en mastocitos

derivados de medula ósea y activados vía IgE reduce la desgranulación (Wen et al. 2014). Existen reportes previos en los que compuestos orgánicos derivados de plantas, afectan la fosforilación de la isoforma PLC γ 1, lo que impide el incremento de calcio intracelular en mastocitos y disminuyendo la desgranulación (Kageyama-Yahara et al. 2011; Lu, Son, and Chang 2012).

El calcio desempeña un papel fundamental en los procesos de desgranulación y producción de citocinas en los mastocitos una vez que se lleva a cabo el entrecruzamiento, se activa la afluencia de calcio vía canales receptores de potencial transitorio (TRPC1), causando un incremento del calcio citoplasmático. Lo anterior permite que la liberación de calcio del retículo endoplásmico dependiente de IP3, se propague la salida de calcio-dependiente de la liberación de calcio almacenado. Por lo que el calcio extracelular en los mastocitos juega un papel importante en la propagación de la señal (Cohen et al. 2009). Hay que considerar que el VAP podría afectar de manera indirecta la liberación del calcio. Es por ello que otros experimentos necesitan ser realizados al respecto para entender si la afectación a la PLC γ afecta los niveles intracelulares de calcio lo que explicaría la disminución de desgranulación.

En conclusión en el presente trabajo se demostró que la leptina no afecta la desgranulación dependiente del Fc ϵ RI en los mastocitos, sin embargo, es indispensable realizar un análisis más detallado al respecto. Para el caso del ácido valproico, se evidencio que el ácido valproico afecta la activación del mastocito, y esto se debe en parte por la disminución de la expresión del Fc ϵ RI y por la disminución de PLC γ fosforilada. Es indispensable explorar otras señales de la activación del mastocito que podrían ser afectadas por el VAP.

8 CONCLUSIONES

- La leptina no afecta la desgranulación dependiente de la vía Fc ϵ RI en mastocitos.
- El VAP a 1 y 2 mM no afecta la viabilidad de los mastocitos.
- La desgranulación y producción de citocinas dependiente de Fc ϵ RI disminuye por la presencia de VAP.
- El VAP afecta selectivamente la expresión de Fc ϵ RI en los mastocitos, sin embargo, no se afecta la fosforilación de las proteínas adaptadoras al entrecruzar el receptor Fc ϵ RI con IgE y el antígeno.
- El VAP disminuye la presencia de PLC γ 2 en mastocitos activados vía Fc ϵ RI

9 BIBLIOGRAFÍA

- Abe, Masatoshi, Motohiro Kurosawa, Osamu Ishikawa, and Yoshiki Miyachi. 2000. "Effect of Mast Cell – Derived Mediators and Mast Cell – Related Neutral Proteases on Human Dermal Fibroblast Proliferation and Type I Collagen Production." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106 (1): 78–84. doi:10.1067/mai.2000.106058.
- Akahoshi, Mitsuteru, Chang Ho Song, Adrian M. Piliponsky, Martin Metz, Andrew Guzzetta, Magnus Åbrink, Susan M. Schlenner, et al. 2011. "Mast Cell Chymase Reduces the Toxicity of Gila Monster Venom, Scorpion Venom, and Vasoactive Intestinal Polypeptide in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 121 (10): 4180–91. doi:10.1172/JCI46139.
- Akimova, Tatiana, Guanghui Ge, Tatiana Golovina, Tatiana Mikheeva, Liqing Wang, James L Riley, and Wayne W Hancock. 2010. "Histone/Protein Deacetylase Inhibitors Increase Suppressive Functions of Human FOXP3+ Tregs." *Clinical Immunology* 136. Elsevier Inc.: 348–63. doi:10.1016/j.clim.2010.04.018.
- Altintas, Mehmet M, Behzad Nayer, Eric C Walford, Kevin B Johnson, Gabriel Gaidosh, Jochen Reiser, Nestor De La Cruz-munoz, Luis M Ortega, and Ali Nayer. 2012. "Leptin Deficiency-Induced Obesity Affects the Density of Mast Cells in Abdominal Fat Depots and Lymph Nodes in Mice." *Lipids in Health and Disease* 11 (21). BioMed Central Ltd. doi:10.1186/1476-511X-11-21.
- Alvarez-Breckenridge, Christopher A., Jianhua Yu, Richard Price, Min Wei, Yan Wang, Michal O. Nowicki, Yoonhee P. Ha, et al. 2012. "The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Lessens NK Cell Action against Oncolytic Virus-Infected Glioblastoma Cells by Inhibition of STAT5/T-BET Signaling and Generation of Gamma Interferon." *Journal of Virology* 86 (8): 4566–77. doi:10.1128/JVI.05545-11.
- Arbez, Jessy, Baptiste Lamarthée, Béatrice Gaugler, and Philippe Saas. 2014. "Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Affects Plasmacytoid Dendritic Cells Phenotype and Function." *Immunobiology* 219 (8): 637–43. doi:10.1016/j.imbio.2014.03.013.
- Armeanu, Sorin, Michael Bitzer, Ulrich M Lauer, Sascha Venturelli, Anita Pathil, Matthias Krusch, Stephan Kaiser, et al. 2005. "Natural Killer Cell-Mediated Lysis of Hepatoma Cells via Specific Induction of NKG2D Ligands by the Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Valproate." *Cancer Research* 65 (14): 6321–29. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4252.
- Bachert, Claus, Philippe Gevaert, Peter Howarth, Gabriele Holtappels, Paul van Cauwenberge, and S.G.O. Johansson. 2003. "IgE to Staphylococcus Aureus Enterotoxins in Serum Is Related to Severity of Asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111 (5): 1131–32. doi:10.1016/S0091-6749(03)70044-X.
- Bartels, Marije, Wouter W van Solinge, Hanneke J. den Breeijen, Marc B Bierings, Paul J Coffey, and Toine C G Egberts. 2012. "Valproic Acid Treatment Is Associated With Altered Leukocyte Subset Development." *Journal of Clinical Psychopharmacology* 32 (6): 832–34. doi:10.1097/JCP.0b013e318270e5e2.
- Beghi, Ettore, and Simon Shorvon. 2011. "Antiepileptic Drugs and the Immune System." *Epilepsia* 52: 40–44. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03035.x.
- Bhat, Jaydeep, Hans-heinrich Oberg, and Dieter Kabelitz. 2015. "Modulation of Human Gamma / Delta T-Cell Activation and Phenotype by Histone Deacetylase Inhibitors." *Cellular Immunology* 296. Elsevier Inc.: 50–56. doi:10.1016/j.cellimm.2015.01.019.
- Bischoff, S C, G Sellge, a Lorentz, W Sebald, R Raab, and M P Manns. 1999. "IL-4 Enhances Proliferation and Mediator Release in Mature Human Mast Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (14): 8080–85. doi:10.1073/pnas.96.14.8080.

- Brightling, Christopher E, Peter Bradding, Fiona a Symon, Stephen T Holgate, Andrew J Wardlaw, and Ian D Pavord. 2002. "Mast-Cell Infiltration of Airway Smooth Muscle in Asthma." *The New England Journal of Medicine* 346 (22): 1699–1705. doi:10.1056/NEJMoa012705.
- Bruno, A., S. Conus, I. Schmid, and H.-U. Simon. 2005. "Apoptotic Pathways Are Inhibited by Leptin Receptor Activation in Neutrophils." *The Journal of Immunology* 174: 8090–96. doi:10.4049/jimmunol.174.12.8090.
- Caldefie-Chezet, F., a. Poulin, and M.-P. Vasson. 2003. "Leptin Regulates Functional Capacities of Polymorphonuclear Neutrophils." *Free Radical Research* 37 (8): 809–14. doi:10.1080/1071576031000097526.
- Campillo-Navarro, Marcia, Alma D Chávez-Blanco, Isabel Wong-Baeza, Jeanet Serafín-López, Raúl Flores-Mejía, Sergio Estrada-Parra, Iris Estrada-García, and Rommel Chacón-Salinas. 2014. "Mast Cells in Lung Homeostasis: Beyond Type I Hypersensitivity." *Current Respiratory Medicine Reviews* 10 (2): 115–23. doi:10.2174/1573398X10666141024220151.
- Chateauvieux, Sébastien, Franck Morceau, Mario Dicato, and Marc Diederich. 2010. "Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1–18. doi:10.1155/2010/479364.
- Cohen, R., A. Torres, H.-T. Ma, D. Holowka, and B. Baird. 2009. "Ca²⁺ Waves Initiate Antigen-Stimulated Ca²⁺ Responses in Mast Cells." *The Journal of Immunology* 183 (10): 6478–88. doi:10.4049/jimmunol.0901615.
- Conus, Sébastien, Andreina Bruno, and Hans Uwe Simon. 2005. "Leptin Is an Eosinophil Survival Factor." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116: 1228–34. doi:10.1016/j.jaci.2005.09.003.
- Crivellato, Enrico, Carlo Alberto Beltrami, Franco Mallardi, and Domenico Ribatti. 2003. "Paul Ehrlich's Doctoral Thesis: A Milestone in the Study of Mast Cells." *British Journal of Haematology* 123: 19–21. doi:10.1007/978-94-024-1675-6_1.
- Cruse, Glenn, Sarah Cockerill, and Peter Bradding. 2008. "IgE Alone Promotes Human Lung Mast Cell Survival through the Autocrine Production of IL-6." *BMC Immunology* 9: 1–9. doi:10.1186/1471-2172-9-2.
- Fasshauer, Mathias, and Matthias Blüher. 2015. "Adipokines in Health and Disease." *Trends in Pharmacological Sciences* 36 (7): 461–70. doi:10.1016/j.tips.2015.04.014.
- Fei, H, H J Okano, C Li, G H Lee, C Zhao, R Darnell, and J M Friedman. 1997. "Anatomic Localization of Alternatively Spliced Leptin Receptors (Ob-R) in Mouse Brain and Other Tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (June): 7001–5. doi:10.1073/pnas.94.13.7001.
- Fitzpatrick, S., R. Joks, and J. I. Silverberg. 2012. "Obesity Is Associated with Increased Asthma Severity and Exacerbations, and Increased Serum Immunoglobulin E in Inner-City Adults." *Clinical & Experimental Allergy* 42: 747–59. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03863.x.
- Föger, Niko, André Jenckel, Zane Orinska, Kyeong-hee Lee, Andrew C Chan, and Silvia Bulfone-paus. 2011. "Differential Regulation of Mast Cell Degranulation versus Cytokine Secretion by the Actin Regulatory Proteins Coronin1a and Coronin1b." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (9): 1777–87. doi:10.1084/jem.20101757.
- Friedman, Jeffrey M, and Jeffrey L Halaas. 1998. "Leptin and the Regulation of Body Weight in Mammals." *Nature* 395: 763–70.
- Frikeche, Jihane, Thomas Simon, Eolia Brissot, Marc Grégoire, Béatrice Gaugler, and Mohamad Mohty. 2012. "Impact of Valproic Acid on Dendritic Cells Function." *Immunobiology* 217 (7): 704–10. doi:10.1016/j.imbio.2011.11.010.

- Gainsford, T, T a Willson, D Metcalf, E Handman, C McFarlane, a Ng, N a Nicola, W S Alexander, and D J Hilton. 1996. "Leptin Can Induce Proliferation, Differentiation, and Functional Activation of Hemopoietic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (December): 14564–68. doi:10.1073/pnas.93.25.14564.
- Galli, Stephen J., Philipp Starkl, Thomas Marichal, and Mindy Tsai. 2016. "Mast Cells and IgE in Defense against Venoms: Possible 'Good Side' of Allergy?" *Allergology International* 65 (1). Elsevier B.V: 3–15. doi:10.1016/j.alit.2015.09.002.
- Galli, Stephen J, and Mindy Tsai. 2012. "IgE and Mast Cells in Allergic Disease." *Nature Medicine* 18 (5). Nature Publishing Group: 693–704. doi:10.1038/nm.2755.
- Gilfillan, Alasdair M, and Christine Tkaczyk. 2006. "Integrated Signalling Pathways for Mast-Cell Activation." *Nature Reviews Immunology*. doi:10.1038/nri1782.
- Gillespie, S R, R R DeMartino, J Zhu, H J Chong, C Ramirez, C P Shelburne, L a Bouton, et al. 2004. "IL-10 Inhibits Fc Epsilon RI Expression in Mouse Mast Cells." *J.Immunol.* 172: 3181–88. doi:10.4049/jimmunol.172.5.3181.
- Godhe-Puranik, Yogita, Caroline F. Thorn, Jatinder K. Lambra, and J. Steven Leeder. 2013. "Valproic Acid Pathway: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics." *Pharmacogenetics and Genomics* 23 (4): 236–41. doi:10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2.Valproic.
- Gottlicher, M., S. Minucci, P. Zhu, O H Krämer, A. Schimpf, S Giavara, J.P. Sleeman, et al. 2001. "Valproic Acid Defines a Novel Class of HDAC Inhibitors Inducing Differentiation of Transformed Cells." *The EMBO Journal* 20 (24): 6969–78. doi:10.1093/emboj/20.24.6969.
- Graham, Amy C., Rachel M. Temple, and Joshua J. Obar. 2015. "Mast Cells and Influenza A Virus: Association with Allergic Responses and Beyond." *Frontiers in Immunology* 6 (May). doi:10.3389/fimmu.2015.00238.
- Gurish, Michael F, and Joshua A Boyce. 2002. "Mast Cell Growth , Differentiation , and Death." *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 22: 107–18.
- Hahn, David L., Allison Schure, Katir Patel, Tawanna Childs, Eduard Drizik, and Wilmore Webley. 2012. "Chlamydia Pneumoniae-Specific IgE Is Prevalent in Asthma and Is Associated with Disease Severity." *PLoS ONE* 7 (4): 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0035945.
- Han, Seon-Young, Ji-Young Bae, Sin-Hye Park, Yun-Ho Kim, Jung Han Yoon Park, and Young-Hee Kang. 2013. "Resveratrol Inhibits IgE-Mediated Basophilic Mast Cell Degranulation and Passive Cutaneous Anaphylaxis in Mice." *The Journal of Nutrition* 143 (5): 632–39. doi:10.3945/jn.112.173302.
- Hundley, Thomas R, Alasdair M Gilfillan, Christine Tkaczyk, Marcus V Andrade, Dean D Metcalfe, and Michael A Beaven. 2004. "Kit and FcεRI Mediate Unique and Convergent Signals for Release of Inflammatory Mediators from Human Mast Cells." *Blood* 104 (8): 2410–17. doi:10.1182/blood-2004-02-0631.
- Ichiyama, Takashi, Kuniyuki Okada, James M. Lipton, Tomoyo Matsubara, Takashi Hayashi, and Susumu Furukawa. 2000. "Sodium Valproate Inhibits Production of TNF-α and IL-6 and Activation of NF-KB." *Brain Research* 857 (1–2): 246–51. doi:10.1016/S0006-8993(99)02439-7.
- Irani, A. A., N. M. Schechter, S. S. Craig, G. DeBlois, and L. B. Schwartz. 1986. "Two Types of Human Mast Cells That Have Distinct Neutral Protease Compositions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (12): 4464–68. doi:10.1073/pnas.83.12.4464.
- Ito, Tomonobu, Daniel Smrz, Mi -Yeon Jung, Geethani Bandara, Avanti Desai, Sárka Smrzová, Hye Sun Kuehn, Michael a Beaven, Dean D Metcalfe, and Alasdair M Gilfillan. 2012. "Stem Cell Factor Programs the Mast Cell Activation Phenotype." *The Journal of Immunology* 188: 5428–

37. doi:10.4049/jimmunol.1103366.
- Jambalgaaniin, Ulziisaikhan, Bilegtsaikhan Tsolmongyn, Naoki Koide, Erdenezaya Odkhuu, Yoshikazu Naiki, Takayuki Komatsu, Tomoaki Yoshida, and Takashi Yokochi. 2014. "A Novel Mechanism for Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Cytokine Production by Valproic Acid." *International Immunopharmacology* 20. Elsevier B.V.: 181–87. doi:10.1016/j.intimp.2014.02.032.
- Johnston, Richard A, Ming Zhu, Yadira M Rivera-sanchez, Frank L Lu, Todd A Theman, Lesley Flynt, and Stephanie A Shore. 2007. "Allergic Airway Responses in Obese Mice." *Am J Respir Crit Care Med* 176: 650–58. doi:10.1164/rccm.200702-323OC.
- Kageyama-Yahara, Natsuko, Xiaoyu Wang, Tatsuo Katagiri, Ping Wang, Takeshi Yamamoto, Makoto Tominaga, and Makoto Kadowaki. 2011. "Suppression of Phospholipase C γ 1 Phosphorylation by Cinnamaldehyde Inhibits Antigen-Induced Extracellular Calcium Influx and Degranulation in Mucosal Mast Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 416 (3–4). Elsevier Inc.: 283–88. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.014.
- Kalesnikoff, Janet, Michael Huber, Vivian Lam, Jacqueline E. Damen, Juan Zhang, Reuben P. Siraganian, and Gerald Krystal. 2001. "Monomeric IgE Stimulates Signaling Pathways in Mast Cells That Lead to Cytokine Production and Cell Survival." *Immunity* 14: 801–11. doi:10.1016/S1074-7613(01)00159-5.
- Kato, Hikari, Shigeharu Ueki, Rie Kamada, Junko Kihara, Yumiko Yamauchi, Tomomi Suzuki, Masahide Takeda, et al. 2011. "Leptin Has a Priming Effect on Eotaxin-Induced Human Eosinophil Chemotaxis." *International Archives of Allergy and Immunology* 155: 335–44. doi:10.1159/000321195.
- Kennedy Norton, S., B. Barnstein, J. Brenzovich, D. P. Bailey, M. Kashyap, K. Speiran, J. Ford, et al. 2008. "IL-10 Suppresses Mast Cell IgE Receptor Expression and Signaling In Vitro and In Vivo." *The Journal of Immunology* 180 (5): 2848–54. doi:10.4049/jimmunol.180.5.2848.
- Kienzler, Anne-Kathrin, Marta Rizzi, Maik Reith, Stephen L. Nutt, and Hermann Eibel. 2013. "Inhibition of Human B-Cell Development into Plasmablasts by Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid." *J Allergy Clin Immunol* 131 (6): 1695–98. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.018.
- Kiernan, J. A. 1979. "Production and Life Span of Cutaneous Mast Cells in Young Rats." *Journal of Anatomy* 128: 225–38.
- Kinney, Shannon R.M., Logan Carlson, Jennifer Ser-Dolansky, Chelsea Thompson, Sagar Shah, Amos Gambah, Wei Xing, Sallie S. Schneider, and Clinton B. Mathias. 2015. "Curcumin Ingestion Inhibits Mastocytosis and Suppresses Intestinal Anaphylaxis in a Murine Model of Food Allergy." *PLoS ONE* 10 (7). doi:10.1371/journal.pone.0132467.
- Kitamura, Yukihiko. 1989. "Heterogeneity of Mast Cells and Phenotypic Change between Subpopulations." *Annual Review of Immunology* 7: 59–76.
- Kitaura, J., W. Xiao, M. Maeda-Yamamoto, Y. Kawakami, C. A. Lowell, and T. Kawakami. 2004. "Early Divergence of Fc γ Receptor I Signals for Receptor Up-Regulation and Internalization from Degranulation, Cytokine Production, and Survival." *The Journal of Immunology* 173 (7): 4317–23. doi:10.4049/jimmunol.173.7.4317.
- Krajewski, Dylan, Edwin Kaczinski, Jeffrey Rovatti, Stephanie Polukort, Chelsea Thompson, Catherine Dollard, Jennifer Ser-Dolansky, Sallie S. Schneider, Shannon R.M. Kinney, and Clinton B. Mathias. 2018. "Epigenetic Regulation via Altered Histone Acetylation Results in Suppression of Mast Cell Function and Mast Cell-Mediated Food Allergic Responses." *Frontiers in Immunology* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02414.
- Kroesen, Michiel, Paul R. Gielen, Ingrid C. Brok, Inna Armandari, Peter M. Hoogerbrugge, and Gosse J. Adema. 2014. "HDAC Inhibitors and Immunotherapy; a Double Edged Sword?"

Oncotarget 5 (16): 6558–72. doi:10.18632/oncotarget.2289.

- Kunder, Christian A, A. L. St John, and Soman N. Abraham. 2011. "Mast Cell Modulation of the Vascular and Lymphatic Endothelium." *Blood* 118 (20): 5383–93. doi:10.1182/blood-2011-07-358432.
- Kuriu, A., S. Sonoda, Y. Kanakura, K. Jozaki, A. Yamatodani, and Y. Kitamura. 1989. "Proliferative Potential of Degranulated Murine Peritoneal Mast Cells." *Blood* 74 (3): 925–29.
- Levi-Schaffer, Francesca, and Meir Shalit. 1993. "Proliferation and Functional Responses of Bone Marrow Derived Mast Cells after Activation." *Cellular Immunology* 148: 435–43.
- Long, Jun, Li Chang, Yan Shen, Wen-hui Gao, Yue-nv Wu, Han-bo Dou, Meng-meng Huang, et al. 2015. "Valproic Acid Ameliorates Graft-versus-Host Disease by Downregulating Th1 and Th17 Cells." *The Journal of Immunology* 195: 1849–57. doi:10.4049/jimmunol.1500578.
- Lorentz, A, S Schwengberg, G Sellge, M P Manns, and S C Bischoff. 2000. "Human Intestinal Mast Cells Are Capable of Producing Different Cytokine Profiles: Role of IgE Receptor Cross-Linking and IL-4." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (1): 43–48. doi:10.1172/jci.1164n1p43 [pii].
- Lu, Yue, Jong Keun Son, and Hyeun Wook Chang. 2012. "Sauceroneol F, a New Lignan Isolated from *Saururus chinensis*, Attenuates Degranulation via Phospholipase C γ 1 Inhibition and Eicosanoid Generation by Suppressing MAP Kinases in Mast Cells." *Biomolecules and Therapeutics* 20 (6): 526–31. doi:10.4062/biomolther.2012.20.6.526.
- Lucie, Guo, Guo Hongtao, Gao Chengjiang, Mi Zhiyong, William B Russell, and Paul C. Kuo. 2007. "Stat1 Acetylation Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Interferon- γ Treated RAW264.7 Murine Macrophages." *Surgery* 142 (2): 156–62.
- Lyberg, Katarina, Hani Abdulkadir Ali, Jennine Grootens, Matilda Kjellander, Malin Tirfing, Michel Arock, Hans Hägglund, Gunnar Nilsson, and Johanna Ungerstedt. 2017. "Histone Deacetylase Inhibitor SAHA Mediates Mast Cell Death and Epigenetic Silencing of Constitutively Active D816V KIT in Systemic Mastocytosis." *Oncotarget* 8 (6): 9647–59.
- Maffei, M, J Halaas, E Ravussin, R E Pratley, G H Lee, Y Zhang, H Fei, S Kim, R Lallone, and S Ranganathan. 1995. "Leptin Levels in Human and Rodent: Measurement of Plasma Leptin and Ob RNA in Obese and Weight-Reduced Subjects." *Nature Medicine* 1: 1155–61. doi:10.1038/nm1195-1155.
- Marshall, Jean S. 2004. "Mast-Cell Responses to Pathogens." *Nature Reviews. Immunology* 4 (10): 787–99. doi:10.1038/nri1460.
- Medina, Jorge L., Edward G. Brooks, Adriana Chaparro, and Peter H. Dube. 2017. "Mycoplasma Pneumoniae CARDS Toxin Elicits a Functional IgE Response in Balb/c Mice." *PLoS ONE* 12 (2): 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0172447.
- Metcalfe, Dean D, Dana Baram, and Yoseph A Mekori. 1997. "Mast Cells." *Physiological Reviews* 77 (4): 1033–79.
- Metcalfe, Dean D, Richard D Peavy, and Alasdair M Gilfillan. 2009. "Mechanisms of Mast Cell Signaling in Anaphylaxis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jaci.2009.08.035.
- Metz, Martin, Adrian M. Piliponsky, Ching-Cheng Chen, Verena Lammel, Magnus Åbrink, Gunnar Pejler, Mindy Tsai, and Stephen J. Galli. 2006. "Mast Cells Can Enhance Resistance to Snake and Honeybee Venoms." *Science* 313 (5786): 526–30. doi:10.1126/science.1128877.
- Mombelli, Matteo, Jérôme Lugin, Ivana Rubino, Anne Laure Chanson, Marlyse Giddey, Thierry Calandra, and Thierry Roger. 2011. "Histone Deacetylase Inhibitors Impair Antibacterial Defenses of Macrophages." *Journal of Infectious Diseases* 204 (9): 1367–74.

doi:10.1093/infdis/jir553.

- Moon, Tae Chul, A. Dean Befus, and Marianna Kulka. 2014. "Mast Cell Mediators: Their Differential Release and the Secretory Pathways Involved." *Frontiers in Immunology* 5 (NOV): 1–18. doi:10.3389/fimmu.2014.00569.
- Munster, Pamela, Douglas Marchion, Elona Bicaku, Mira Lacevic, Jongphil Kim, Barbara Centeno, Adil Daud, Anthony Neuger, Susan Minton, and Daniel Sullivan. 2009. "Clinical and Biological Effects of Valproic Acid as a Histone Deacetylase Inhibitor on Tumor and Surrogate Tissues: Phase I/II Trial of Valproic Acid and Epirubicin/FEC." *Clinical Cancer Research* 15 (7): 2488–96. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1930.
- Ni, Lulu, Lixin Wang, Chao Yao, Zhongya Ni, Fei Liu, Chenyuan Gong, Xiaowen Zhu, et al. 2017. "The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Inhibits NKG2D Expression in Natural Killer Cells through Suppression of STAT3 and HDAC3." *Scientific Reports* 7 (September 2016). Nature Publishing Group. doi:10.1038/srep45266.
- Nieto-Patlán, Alejandro, Marcia Campillo-Navarro, Octavio Rodríguez-Cortés, Samira Muñoz-Cruz, Isabel Wong-Baeza, Sergio Estrada-Parra, Iris Estrada-García, Jeanet Serafín-López, and Rommel Chacón-Salinas. 2015. "Recognition of *Candida Albicans* by Dectin-1 Induces Mast Cell Activation." *Immunobiology* 220: 1093–1100. doi:10.1016/j.imbio.2015.05.005.
- Nieto-Patlán, Erik, Jeanet Serafín-López, Isabel Wong-Baeza, Sonia M Pérez-Tapia, Laura Cobos-Marín, Sergio Estrada-Parra, Iris Estrada-García, Alma D Chávez-Blanco, and Rommel Chacón-Salinas. 2019. "Valproic Acid Promotes a Decrease in Mycobacterial Survival by Enhancing Nitric Oxide Production in Macrophages Stimulated with IFN- γ ." *Tuberculosis* 114. Elsevier: 123–26. doi:10.1016/j.tube.2018.12.007.
- Novak, N., S. Kraft, and T. Bieber. 2001. "IgE Receptors." *Current Opinion in Immunology* 13 (6): 721–26. doi:10.1016/S0952-7915(01)00285-0.
- Okayama, Yoshimichi, Hiroyuki Kobayashi, Leonie K. Ashman, Kunio Dobashi, Tsugio Nakazawa, Stephan T. Holgate, Martin K. Church, and Masatomo Mori. 1998. "Human Lung Mast Cells Are Enriched in the Capacity to Produce Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Response to IgE-Dependent Stimulation." *European Journal of Immunology* 28 (2): 708–15. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<708::AID-IMMU708>3.0.CO;2-A.
- Ouchi, N, J L Parker, J J Lugus, and K Walsh. 2011. "Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease." *Nat.Rev.Immunol.* 11 (2). Nature Publishing Group: 85–97. doi:nri2921 [pii];10.1038/nri2921 [doi].
- Padawer, J. 1974. "Mast Cells: Extended Lifespan and Lack of Granule Turnover under Normal in Vivo Conditions." *Experimental and Molecular Pathology* 20 (2): 269–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4363128>.
- Phiel, Christopher J., Fang Zhang, Eric Y. Huang, Matthew G. Guenther, Mitchell A. Lazar, and Peter S. Klein. 2001. "Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen." *Journal of Biological Chemistry* 276 (39): 36734–41. doi:10.1074/jbc.M101287200.
- Porebski, Grzegorz, Kamila Kwiecien, Magdalena Pawica, and Mateusz Kwitniewski. 2018. "Mas-Related G Protein-Coupled Receptor-X2 (MRGPRX2) in Drug Hypersensitivity Reactions." *Frontiers in Immunology* 9 (December): 3027. doi:10.3389/fimmu.2018.03027.
- Qiao, Huihong, Marcus V. Andrade, Felipe A. Lisboa, Katrina Morgan, and Michael A. Beaven. 2006. "Fc ϵ R1 and Toll-like Receptors Mediate Synergistic Signals to Markedly Augment Production of Inflammatory Cytokines in Murine Mast Cells." *Blood* 107 (2): 610–18. doi:10.1182/blood-2005-06-2271.
- Rantala, Aino, Jouni J K Jaakkola, and Maritta S. Jaakkola. 2013. "Respiratory Infections in Adults

- with Atopic Disease and IgE Antibodies to Common Aeroallergens." *PLoS ONE* 8 (7): 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0068582.
- Raso, Giuseppina Mattace, Maria Pacilio, Emanuela Esposito, Anna Coppola, Raffaele Di Carlo, and Rosaria Meli. 2002. "Leptin Potentiates IFN-Gamma-Induced Expression of Nitric Oxide Synthase and Cyclo-Oxygenase-2 in Murine Macrophage J774A.1." *British Journal of Pharmacology* 137: 799–804. doi:10.1038/sj.bjp.0704903.
- Royce, Simon G., William Dang, Katherine Ververis, Nishika de Sampayo, Assam El Osta, Mimi L K Tang, and Tom C. Karagiannis. 2011. "Protective Effects of Valproic Acid against Airway Hyperresponsiveness and Airway Remodeling in a Mouse Model of Allergic Airways Disease." *Epigenetics* 6 (12): 1463–70. doi:10.4161/epi.6.12.18396.
- Royce, Simon G., and Tom C. Karagiannis. 2012. "Histone Deacetylases and Their Role in Asthma." *Journal of Asthma* 49 (2): 121–28. doi:10.3109/02770903.2011.648298.
- Royce, Simon G., Katherine Ververis, and Tom C. Karagiannis. 2012. "Histone Deacetylase Inhibitors: Can We Consider Potent Anti-Neoplastic Agents for the Treatment of Asthma?" *Annals of Clinical and Laboratory Science* 42 (3): 338–45.
- Ryan, J J, S DeSimone, G Klisch, Christopher P Shelburne, L J McReynolds, K Han, R Kovacs, P Mirmonsef, and T F Huff. 1998. "IL-4 Inhibits Mouse Mast Cell Fc EpsilonRI Expression through a STAT6-Dependent Mechanism." *The Journal of Immunology* 161 (12): 6915–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862725>.
- Shi, Xiumin, Min Li, Meizi Cui, Chao Niu, Jianting Xu, Lei Zhou, Wei Li, et al. 2016. "Epigenetic Suppression of the Antitumor Cytotoxicity of NK Cells by Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid." *Am J Cancer Res* 6 (3): 600–614.
- Shore, Stephanie A, Igor N Schwartzman, Matthew S Mellema, Lesley Flynt, Amy Imrich, and Richard A Johnston. 2005. "Effect of Leptin on Allergic Airway Responses in Mice." *J Allergy Clin Immunol* 115 (1): 103–9. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.007.
- Sideleva, Olga, Kendall Black, and Anne E Dixon. 2013. "Effects of Obesity and Weight Loss on Airway Physiology and Inflammation in Asthma." *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 26 (4). Elsevier Ltd: 455–58. doi:10.1016/j.pupt.2012.05.002.
- Sihra, Bhupinder Singh, Onn Min Kon, John Andrew Grant, and A. Barry Kay. 1997. "Expression of High-Affinity IgE Receptors (FcεRI) on Peripheral Blood Basophils, Monocytes, and Eosinophils in Atopic and Nonatopic Subjects: Relationship to Total Serum IgE Concentrations." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99 (5): 699–706. doi:10.1016/S0091-6749(97)70033-2.
- Siraganian, Reuben P, Rodrigo O de Castro, Emilia A Barbu, and Juan Zhang. 2010. "Mast Cell Signaling : The Role of Protein Tyrosine Kinase Syk, Its Activation and Screening Methods for New Pathway Participants." *FEBS Letters* 584 (24). Federation of European Biochemical Societies: 4933–40. doi:10.1016/j.febslet.2010.08.006.
- Stone, Kelly D., Calman Prussin, and Dean D. Metcalfe. 2010. "IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2). Elsevier Ltd: S73–80. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.017.
- Suzukawa, M., H. Nagase, I. Ogahara, K. Han, H. Tashimo, a. Shibui, R. Koketsu, S. Nakae, M. Yamaguchi, and K. Ohta. 2011. "Leptin Enhances Survival and Induces Migration, Degranulation, and Cytokine Synthesis of Human Basophils." *The Journal of Immunology* 186: 5254–60. doi:10.4049/jimmunol.1004054.
- Taildeman, Jasmien, Claudina a. Pérez-Novó, Isabelle Rottiers, Liesbeth Ferdinande, Anouk Waeytens, Veerle De Colvenaer, Claus Bachert, et al. 2009. "Human Mast Cells Express Leptin and Leptin Receptors." *Histochemistry and Cell Biology* 131: 703–11.

doi:10.1007/s00418-009-0575-3.

- Tartaglia, L A, M Dembski, X Weng, N Deng, J Culpepper, R Devos, G J Richards, et al. 1995. "Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R." *Cell* 83: 1263–71. doi:0092-8674(95)90151-5 [pii].
- Theoharides, Theoharis C, Konstantinos-Dionysios Alysandratos, Asimena Angelidou, Danae-Anastasia Delivanis, Nikolaos Sismanopoulos, Bodi Zhang, Shahrzad Asadi, et al. 2012. "Mast Cells and Inflammation." *Biochimica et Biophysica Acta* 1822 (1). Elsevier B.V.: 21–33. doi:10.1016/j.bbadis.2010.12.014.
- Theoharides, Theoharis C, Duraisamy Kempuraj, Michael Tagen, Pio Conti, and Dimitris Kalogeromitros. 2007. "Differential Release of Mast Cell Mediators and the Pathogenesis of Inflammation." *Immunological Reviews* 217 (June): 65–78. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00519.x.
- Toru, H, C Ra, S Nonoyama, K Suzuki, J Yata, and T Nakahata. 1996. "Induction of the High-Affinity IgE Receptor (Fc Epsilon RI) on Human Mast Cells by IL-4." *International Immunology* 8 (9): 1367–73.
- Trautmann, Axel, Atiye Toksoy, Eva Engelhardt, Eva-B Bröcker, and Reinhard Gillitzer. 2000. "Mast Cell Involvement in Normal Human Skin Wound Healing : Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Is Correlated with Recruitment of Mast Cells Which Synthesize Interleukin-4 in Vivo." *Journal of Pathology* 190: 100–106.
- van Huisstede, Astrid, Arjan Rudolphus, Manuel Castro Cabezas, Laser Ulas Biter, Gert-Jan van de Geijn, Christian Taube, Pieter S Hiemstra, and Gert-Jan Braunstahl. 2015. "Effect of Bariatric Surgery on Asthma Control, Lung Function and Bronchial and Systemic Inflammation in Morbidly Obese Subjects with Asthma." *Thorax* 70: 659–67. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-206712.
- Vesta, Kimi S., and Patrick J. Medina. 2003. "Valproic Acid-Induced Neutropenia." *The Annals of Pharmacotherapy* 37: 819–21. doi:10.1345/aph.1C381.
- Vrba, J., P. Dolezel, and J. Ulrichova. 2010. "Neutrophilic Differentiation Modulates the Apoptotic Response of HL-60 Cells to Sodium Butyrate and Sodium Valproate." *Neoplasma* 57 (5): 438–48. doi:10.4149/neo.
- Wada, Nobuhiro, Satoshi Hirako, Fumiko Takenoya, Haruaki Kageyama, Mai Okabe, and Seiji Shioda. 2014. "Leptin and Its Receptors." *Journal of Chemical Neuroanatomy* 61–62. Elsevier B.V.: 191–99. doi:10.1016/j.jchemneu.2014.09.002.
- Welle, Monika. 1997. "Development, Significance, and Heterogeneity of Mast Cells with Particular Regard to the Mast Cell-Specific Proteases Chymase and Trypsin." *Journal of Leukocyte Biology* 61 (3): 233–45. doi:10.1002/jlb.61.3.233.
- Weller, Karsten, Kerstin Foitzik, Ralf Paus, Wolfgang Syska, and Marcus Maurer. 2006. "Mast Cells Are Required for Normal Healing of Skin Wounds in Mice." *The FASEB Journal* 20 (13): 2366–68. doi:10.1096/fj.06-5837fje.
- Wen, R., S.-T. Jou, Y. Chen, A. Hoffmeyer, and D. Wang. 2014. "Phospholipase Cg2 Is Essential in the Functions of B Cell and Several Fc Receptors." *The Journal of Immunology* 169 (12): 6743–52. doi:10.4049/jimmunol.169.12.6743.
- Wernersson, Sara, and Gunnar Pejler. 2014. "Mast Cell Secretory Granules: Armed for Battle." *Nature Reviews Immunology* 14 (7). Nature Publishing Group: 478–94. doi:10.1038/nri3690.
- Wong, Chun Kwok, P. F Y Cheung, and C. W K Lam. 2007. "Leptin-Mediated Cytokine Release and Migration of Eosinophils: Implications for Immunopathophysiology of Allergic Inflammation." *European Journal of Immunology* 37: 2337–48. doi:10.1002/eji.200636866.

- Yamaguchi, M, C S Lantz, H C Oettgen, I M Katona, T Fleming, I Miyajima, J P Kinet, and S J Galli. 1997. "IgE Enhances Mouse Mast Cell Fc(Epsilon)RI Expression in Vitro and in Vivo: Evidence for a Novel Amplification Mechanism in IgE-Dependent Reactions." *The Journal of Experimental Medicine* 185 (4): 663–72. doi:10.1084/jem.185.4.663.
- Zarkesh-Esfahani, H., G. Pockley, R. a. Metcalfe, M. Bidlingmaier, Z. Wu, a. Ajami, a. P. Weetman, C. J. Strasburger, and R. J. M. Ross. 2001. "High-Dose Leptin Activates Human Leukocytes Via Receptor Expression on Monocytes." *The Journal of Immunology* 167: 4593–99. doi:10.4049/jimmunol.167.8.4593.
- Zarkesh-Esfahani, H, Alan G Pockley, Zida Wu, Paul G Hellewell, Anthony P Weetman, and Richard J M Ross. 2004. "Leptin Indirectly Activates Human Neutrophils via Induction of TNF-Alpha." *Journal of Immunology* 172: 1809–14. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1809.
- Żelechowska, Paulina, Justyna Agier, Sylwia Różalska, Magdalena Wiktorska, and Ewa Brzezińska-Błaszczuk. 2018. "Leptin Stimulates Tissue Rat Mast Cell Pro-Inflammatory Activity and Migratory Response." *Inflammation Research* 67 (9). Springer International Publishing: 789–99. doi:10.1007/s00011-018-1171-6.
- Żelechowska, Paulina, Magdalena Wiktorska, Sylwia Różalska, Olga Stasikowska-Kanicka, Małgorzata Wągrowaska-Danilewicz, Justyna Agier, and Ewa Brzezińska-Błaszczuk. 2018. "Leptin Receptor Is Expressed by Tissue Mast Cells." *Immunologic Research* 66 (5): 557–66. doi:10.1007/s12026-018-9029-0.
- Zhang, Hanying, Min Du, Qiyuan Yang, and Mei Jun Zhu. 2016. "Butyrate Suppresses Murine Mast Cell Proliferation and Cytokine Production through Inhibiting Histone Deacetylase." *Journal of Nutritional Biochemistry* 27. Elsevier B.V.: 299–306. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.09.020.
- Zhou, Yi, Xueqing Yu, Huimei Chen, Sara Sjöberg, Joséphine Roux, Lijun Zhang, Al-habib Ivoulsou, et al. 2015. "Leptin Deficiency Shifts Mast Cells toward Anti-Inflammatory Actions and Protects Mice from Obesity and Diabetes by Polarizing M2 Macrophages." *Cell Metabolism* 22 (6): 1045–58. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.013.