



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DE LICENCIATURA

“Efecto de la Histamina en la Señalización de Ca^{2+} Intracelular en Fibroblastos de Pulmón Humano de la Línea Celular WI-38”

Para obtener el grado de:

Médico cirujano y partero

Presenta

Verónica Ajelet Vargaz Guadarrama

Director

DC. Roberto Berra Romani
Facultad de Medicina, BUAP

Codirector

DC. Mario García Carrasco
Facultad de Medicina, BUAP

Heroica Puebla de Zaragoza, octubre de 2021

Índice

1. Resumen	1
2. Abreviaturas.....	3
3. Índice de figuras	5
4. Índice de tablas	7
5. Introducción	8
6. Antecedentes generales.....	9
6.1.1. Definición de Asma.....	9
6.1.2. Prevalencia	10
6.1.3. Etiología y factores de riesgo	11
6.1.4. Fenotipos del asma	11
6.1.5. Endotipos del asma	13
6.1.6. Fisiopatología de la remodelación pulmonar	15
6.1.7. Fibroblastos y remodelación pulmonar	17
6.1.8. Regulación del Ca^{2+} intracelular en fibroblastos	19
6.1.9. Histamina	21
7. Antecedentes específicos	25
8. Justificación	26
9. Planteamiento del problema	27
10. Hipótesis Científica.....	27
11. Objetivos.....	27
11.1. Objetivo General	27
11.2. Objetivos Particulares	28
12. Material y métodos	28
12.1. Diseño del estudio	28
12.2. Ubicación espaciotemporal	28
12.3. Muestreo	28
12.3.1. Definición de la unidad de población	28
12.3.2. Criterios de selección de las unidades de muestreo	28
12.4. Definición de las variables y escalas de medición	29
12.5. Técnicas y procedimientos	31
12.5.1. Cultivo celular	31
12.5.2. Soluciones fisiológicas	32
12.5.3. Medición de la $[Ca^{2+}]_i$	32
12.6. Procedimiento experimental por objetivos	34

12.7. Análisis de datos	35
12.8. Diseño estadístico	35
13. Logística	36
13.1. Recursos humanos	36
13.2. Recursos materiales y financieros	36
14. Resultados	36
14.1. La histamina causa una señal de Ca^{2+} heterogénea en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38.	36
14.2. La histamina genera una señal de Ca^{2+} de manera concentración-dependiente en fibroblastos WI-38.	38
14.3. Desensibilización de la señal de Ca^{2+} , por la repetida estimulación de los fibroblastos de pulmón humano con histamina.	40
14.4. La elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ evocada por histamina en fibroblastos pulmonares es mediada principalmente mediante la activación del H_1R y en menor medida a través del H_2R .	41
14.5. La señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos pulmonares WI-38 no implica la activación de la subunidad α_i de la proteína G.	43
14.6. La histamina genera una señal de Ca^{2+} a través de la activación de la PLC y la liberación de Ca^{2+} del RE.	44
14.7. Los receptores de IP_3 del RE tienen una participación importante en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38.	46
14.8. La entrada de Ca^{2+} extracelular contribuye en la señal intracelular de Ca^{2+} inducida por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38.	48
14.9. La entrada de Ca^{2+} a través de los SOC juega un papel importante en la meseta y oscilaciones del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina en fibroblastos pulmonares WI-38.	50
14.10. El bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a través de los VOC no afecta la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por histamina.	51
15. Discusión	54
16. Conclusiones	61
17. Bibliografía	63

1. Resumen

Antecedentes: el asma es una enfermedad crónica inflamatoria de las vías respiratorias que se caracteriza por presentar broncoconstricción, hiperreactividad bronquial y remodelación pulmonar. La remodelación pulmonar es un proceso complejo que implica cambios en la arquitectura pulmonar, estos cambios incluyen un aumento en la deposición de la matriz extracelular, fibrosis subepitelial e incremento en el número de miofibroblastos. Los fibroblastos juegan un papel fundamental en la fisiopatología de la remodelación pulmonar y su función depende de la señalización de Ca^{2+} intracelular. Diversos estudios han reportado concentraciones elevadas de histamina en las vías respiratorias de pacientes con asma. Resultados preliminares en nuestro laboratorio demuestran que la histamina activa una señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares humanos, nuestra hipótesis es que la histamina genera una señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares a través de la activación de receptores histaminérgicos, liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y entrada de Ca^{2+} del medio extracelular.

Objetivo: caracterizar la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38.

Métodos: el presente estudio fue experimental y homodémico. Se emplearon fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38, de los pasajes 5-10 con una confluencia mínima del 75%. Los fibroblastos se incubaron con Fura-2 acetoximetil éster (3 μM) y las señales de Ca^{2+} se registraron mediante técnicas microfluorimétricas, se aplicó histamina, antihistamínicos y antagonistas de diversos mecanismos implicados en la señal de Ca^{2+} . Las imágenes obtenidas se analizaron con el software ImageJ, la elaboración de gráficas y el análisis estadístico se llevó a cabo con los programas Origin Pro 2021 y GraphPad Prism 8.0, se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

Resultados: La aplicación de histamina en fibroblastos de pulmón humano provocó diferentes patrones en la señal de Ca^{2+} que consistieron en un aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} (pico) que puede ser seguido por un aumento sostenido de la concentración de Ca^{2+} (meseta) y/o aumentos periódicos de la

concentración de Ca^{2+} (oscilaciones). La histamina generó un incremento en el Ca^{2+} intracelular de manera concentración-dependiente con una concentración efectiva media máxima (EC_{50}) de $5.49 \mu\text{M}$ y la aplicación consecutiva de histamina a concentraciones máximas en un mismo fibroblasto reveló que existe desensibilización homóloga en el receptor. La histamina ejerce su actividad a través del receptor a histamina H1 principalmente y en menor medida a través del receptor a histamina H2. La manipulación farmacológica reveló que la histamina induce una señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares mediante la activación de la fosfolipasa C, la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares sensibles a IP_3 y la entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares de Ca^{2+} . En adición, la remoción de Ca^{2+} extracelular, así como la aplicación de antagonistas de los receptores a inositol 1,4,5 trifosfato, antagonistas selectivos y no selectivos de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} operados por almacenes intracelulares de Ca^{2+} durante la meseta y oscilaciones causó la abolición de éstas. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje no parecen estar implicados en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina.

Conclusión: En virtud de los resultados, confirmamos la hipótesis de que la histamina genera una señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano fetal de la línea WI-38 de manera concentración-dependiente, generando una señal de Ca^{2+} heterogénea la cual se produce a través de los receptores H1 y H2 mediante la activación de la fosfolipasa C, la salida de Ca^{2+} de almacenes intracelulares, así como la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de la entrada de Ca^{2+} operada por almacenamiento. En este contexto, nuestros resultados proporcionan la primera caracterización detallada del efecto que ejerce la histamina sobre la señalización de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares normales de la línea celular WI-38 y podrían contribuir a la comprensión del papel de la histamina en fibroblastos durante el proceso de remodelación pulmonar.

2. Abreviaturas

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
∅Ca²⁺	Solución salina fisiológica libre de calcio
Ca²⁺	Ion calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
DAG	Diacilglicerol
DCs	Células dendríticas
EC50	Concentración efectiva media máxima
EE	Error estándar
Fura 2-AM	Fura-2 acetoximetil éster
Gd³⁺	Gadolinio
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
H₁R	Receptor de histamina tipo 1
H₂R	Receptor de histamina tipo 2
H₃R	Receptor de histamina tipo 3
H₄R	Receptor de histamina tipo 4
IP₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
IP₃R	Receptor de inositol trifosfato
La³⁺	Lantano
MEC	Matriz extracelular
NCX	Intercambiador sodio/calcio
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP/Proteína quinasa A
PLC	Fosfolipasa C

PMCA	Bomba ATP-asa de calcio de la membrana plasmática
PSS	Solución salina fisiológica
RE	Retículo endoplásmico
ROC	Canales operados por receptores
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Bomba ATP-asa de calcio del retículo sarcoplásmico
SMOC	Canales operados por segundos mensajeros
SOC	Canales operados por almacenes intracelulares de calcio
SOCE	Entrada de calcio activada por los almacenes intracelulares
STIM	Moléculas de interacción estromal
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th2	Células T cooperadoras clásicas de tipo 2
TSLP	Linfopoyetina estromal tímica
VOC	Canales de calcio operados por voltaje

3. Índice de figuras

Figura 1. Vía inflamatoria del perfil T2 alto en el asma.

Figura 2. Representación esquemática de la remodelación de la vía aérea.

Figura 3. Diferenciación del fibroblasto pulmonar a miofibroblasto y su contribución a la remodelación pulmonar.

Figura 4. Representación de los posibles mecanismos que regulan la señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares.

Figura 5. Panorama general de las principales funciones de los receptores de histamina.

Figura 6. Cascada de señalización canónica para cada receptor histaminérgico.

Figura 7. Variables de medición de los registros de Ca^{2+} intracelular en fibroblastos WI-38.

Figura 8. Esquematización de la medición de Ca^{2+} intracelular.

Figura 9. Heterogeneidad en la respuesta de Ca^{2+} provocada por histamina en fibroblastos WI-38.

Figura 10. La histamina a distintas concentraciones provocó diferentes patrones y número de oscilaciones en la señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares WI-38.

Figura 11. Efecto concentración dependiente de la histamina sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

Figura 12. Efecto de la aplicación consecutiva de histamina $300\mu\text{M}$ sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

Figura 13. Participación de los receptores histaminérgicos en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos pulmonares WI-38.

Figura 14. El pretratamiento de fibroblastos pulmonares WI-38 con la toxina pertussis, inhibidor selectivo de la subunidad α_i de la proteína G, no inhibe la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por histamina.

Figura 15. Efecto de la inhibición selectiva de la PLC y el vaciamiento del RE sobre la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

Figura 16. Participación de los receptores de IP_3 en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

Figura 17. Efecto de la remoción del Ca^{2+} extracelular sobre la señal de Ca^{2+} evocada por Histamina en fibroblastos WI-38.

Figura 18. Efecto del bloqueo de la SOCE en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos pulmonares.

Figura 19. Efecto del bloqueo inespecífico de los VOC por níquel en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

Figura 20. Efecto del bloqueo específico de los VOC por nifedipina en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

4. Índice de tablas

Tabla 1. Diseño del estudio.

Tabla 2. Definición de las variables y escalas de medición.

5. Introducción

El asma es una enfermedad crónica de las vías respiratorias, disminuye la calidad de vida de los que la padecen y puede llegar a ser mortal. Alrededor de 300 millones de personas padecen asma en todo el mundo y es probable que en 2025 otros 100 millones se vean afectados (1). El asma se caracteriza por una inflamación alérgica y crónica de las vías respiratorias, estudios multifacéticos han esclarecido la compleja red de respuestas inflamatorias de la fisiopatología del asma que involucra la liberación de mediadores inflamatorios como la histamina, citocinas, quimiocinas y proteasas. La terapia con corticoesteroides inhalados es la más eficaz para el tratamiento del asma persistente y ha mejorado drásticamente los síntomas, sin embargo, cuando se requiere tratamiento con corticosteroides inhalados en dosis altas, más un segundo controlador (y/o corticosteroides sistémicos) para mantener el control de los síntomas o los síntomas son incontrolables hablamos de asma grave (2). En este caso se ha descrito una limitación irreversible del flujo de aire, así como alteraciones en la arquitectura de las vías respiratorias, lo que se denomina remodelación pulmonar. Las características patológicas de la remodelación pulmonar incluyen aumento de la deposición de la matriz extracelular, fibrosis subepitelial y activación de fibroblastos (3). Se ha informado que el número de fibroblastos y el tamaño de las células de músculo liso se asocian negativamente con el volumen espiratorio forzado prebroncodilatador y posbroncodilatador en 1 segundo en pacientes asmáticos (4), así mismo se ha reportado que la concentración de histamina, mastocitos y basófilos en el lavado broncoalveolar de los pacientes asmáticos fue significativamente mayor que el encontrado en sujetos sanos (5), el nivel de ARNm de la L-histidina descarboxilasa, una sintasa de histamina, se encontró notablemente elevado en el tejido pulmonar de los pacientes con muerte por asma (6) y también se ha descrito que en pacientes con asma moderado o grave existen alteraciones en el transporte de la histamina en las vías respiratorias (7). Por otra parte se ha descrito que la histamina genera una señal de calcio (Ca^{2+}) en fibroblastos pulmonares extraídos de donantes cadavéricos así como también en fibroblastos pulmonares de la línea celular HFL-1 (8,9). Estos datos en conjunto sugieren una fuerte interacción entre los fibroblastos pulmonares y la histamina en la fisiopatología del asma. En los

siguientes capítulos de este trabajo de investigación se abordan los temas relacionados a la histamina, los fibroblastos pulmonares y a la señalización de Ca^{2+} intracelular, se exponen y analizan los resultados obtenidos y al final se describe el efecto que genera la histamina en la señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares de la línea celular WI-38.

6. Antecedentes generales

6.1.1. Definición de Asma

El asma es una palabra muy antigua, derivada del sánscrito “vayu” que significa “viento” se abrió camino en el griego como “aazein” que significa jadear y a través del latín ingresó al inglés medio como asma (10). El asma es un término con largo recorrido histórico, se ha utilizado durante milenios, fue referida ampliamente en la literatura clásica por autores como Homero en la Iliada para describir la extrema falta de aliento de los héroes cansados en la batalla, por Esquilo, Píndaro, Platón, entre otros escritores; inicialmente no se asoció con la enfermedad, se empleó para referirse a cualquier condición caracterizada por falta de aire aguda no fisiológica (11). En la literatura médica hipocrática ya es tratada como un trastorno que afecta las vías respiratorias, sin embargo, el término se perfeccionó hasta la última parte del siglo XIX después de la publicación del tratado de Henry Hyde Salter con el título "On asthma: its pathology and treatment" (12). En este trabajo académico, Salter definió el asma como “Disnea paroxística de carácter peculiar con intervalos de respiración saludable entre ataques”, esta descripción captura el concepto de una patología en la que las vías respiratorias se estrechan por una contracción del músculo liso de la pared bronquial (13,14).

Actualmente la “Global Initiative for Asthma” define al asma como “Una enfermedad heterogénea, generalmente caracterizada por inflamación crónica de las vías respiratorias, que se define por la historia clínica de síntomas respiratorios como sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho y tos que varían en intensidad y frecuencia, junto con una limitación variable del flujo de aire espiratorio” (15).

6.1.2. Prevalencia

El asma es una de las principales enfermedades crónicas no transmisibles en el mundo, impacta sustancialmente en los sistemas de salud y de asistencia sanitaria, del mismo modo, afecta la calidad de vida de las personas que la padecen ya que es una causa importante de absentismo laboral y escolar, así como de hospitalización (16). Se considera que el número de años de vida ajustados en función de la discapacidad que se pierden a causa del asma es similar a la tasa estimada en enfermedades como la cirrosis hepática, esquizofrenia y diabetes mellitus (17). Un análisis sistemático realizado por la “Global Burden of Disease” estimó que en el año 2019 el asma afectó a 262 millones de personas y causó 461 000 muertes alrededor del mundo, afectando en mayor porcentaje al sexo femenino (18). La prevalencia es mayor en los países desarrollados y menor en los países en vías de desarrollo, sin embargo, esto puede deberse a una subestimación en aquellos países de bajos recursos donde no se encuentran disponibles los medicamentos básicos para el tratamiento del asma y donde los pacientes tienen dificultades para el acceso a la atención médica, por lo cual no pueden recibir un diagnóstico adecuado (19).

Debido a las diferencias en los protocolos diagnósticos y a la limitación del acceso a la atención médica en algunos países es difícil estimar la prevalencia global del asma, sin embargo, se han realizado esfuerzos importantes en los que se incluyen grandes estudios multinacionales en niños, tal es el caso de “The International Study of Asthma and Allergies in Childhood” (ISAAC), el estudio de la fase I de la “Global Asthma Network”, y en adultos “The European Community Respiratory Health Survey II”.

En México los datos epidemiológicos indican que la prevalencia de asma en adultos es de 3.3% en hombres y 6.2% en mujeres (20); por otro lado, un estudio realizado con metodología ISAAC, reportó que la prevalencia de antecedente de síntomas asmáticos es de 19.2% en adolescentes y 17% en niños, enfatizando que esto cambia cuando se reporta un antecedente de sibilancias en los últimos 12 meses, siendo la prevalencia mayor en niños (9.9%) en contraste con adolescentes (6.8%) (21). Recientemente, un estudio transversal comparativo siguiendo la metodología oficial de la “Global Asthma Network”, reportó que la prevalencia del asma en la Ciudad

de México es ahora más alta que la prevalencia en 2003. Casi el 20% de los adolescentes presentan síntomas de asma al menos una vez en la vida. Desde el estudio ISAAC realizado hace más de una década, ha habido un aumento del 7,8% en la prevalencia de síntomas de asma en niños (22).

Si bien, la incidencia y la prevalencia son más altas en la infancia, los adultos tienen mayor probabilidad de presentar cuadros de severidad ya que la mortalidad y morbilidad son más altas en este sector poblacional (1).

6.1.3. Etiología y factores de riesgo

A pesar del creciente conocimiento del asma en las últimas décadas aún se desconocen las razones por las cuales existe una mayor prevalencia en ciertos lugares que en otros. Su etiología se atribuye a las interacciones existentes entre la predisposición o susceptibilidad genética (loci en genes de susceptibilidad al asma) (23,24), los factores del huésped (sexo, obesidad, nutrición, infecciones, sensibilización alérgica, medicación y factores perinatales) y las exposiciones ambientales a alérgenos (como el tabaquismo, la contaminación ambiental, la endotoxina del ácaro del polvo doméstico, polen, moho, la exposición ocupacional y la urbanización) (25). La evidencia actual sugiere que el asma no es una sola enfermedad, sino un grupo de fenotipos heterogéneos con diferentes procesos patológicos subyacentes, multifactoriales y complejos.

6.1.4. Fenotipos del asma

El fenotipo corresponde a las propiedades observables de un organismo que son producidas por las interacciones del genotipo y el medio ambiente (26). Se les llama “fenotipos del asma” a aquellos grupos reconocibles que comparten factores desencadenantes, comorbilidades, gravedad, severidad, características demográficas, clínicas y fisiopatológicas (15,26–28).

Los fenotipos identificados basados en las características clínicas son numerosos, algunos de los más frecuentes descritos por la “Global Initiative for Asthma” son:

El asma extrínseco o alérgico: es el fenotipo del asma más común (29), es el más fácil de reconocer, se presenta más comúnmente en la infancia y se relaciona con

la historia familiar, así como antecedentes de enfermedades alérgicas como eccema atópico, rinitis alérgica y alergia a los medicamentos o alimentos; en el examen citológico de esputo inducido, las muestras de estos pacientes tienden a presentar inflamación eosinofílica de las vías respiratorias; este fenotipo tiene una respuesta favorable a la terapia con corticoesteroides inhalados (15).

El asma intrínseco o no alérgico: incluye ese subconjunto de sujetos con asma en los que no se puede demostrar la sensibilización alérgica. Estas personas deben tener una prueba de punción cutánea negativa o una prueba de inmunoglobulina E (IgE) específica in vitro para un panel de alérgenos estacionales y perennes; los niveles séricos de IgE total deben ser normales o bajos (30). Los pacientes con este fenotipo a menudo muestran una menor respuesta a corto plazo a los corticoesteroides inhalados (15).

El asma de inicio en la edad adulta o de inicio tardío: se refiere al asma presentado por primera vez en la vida adulta, particularmente existe una mayor prevalencia en las mujeres; los pacientes con este fenotipo no son propensos a presentar alergias, debe descartarse el asma de carácter ocupacional. Por lo regular requieren dosis más elevadas de corticoesteroides inhalados y tienden a presentar una relativa refractariedad al tratamiento con corticosteroides (15).

Asma relacionado con la obesidad: algunos pacientes obesos con asma tienen poca inflamación eosinofílica de las vías respiratorias y presentan síntomas respiratorios (15).

Asma con limitación persistente del flujo de aire: a pesar de que el asma se considera una condición de obstrucción de flujo de aire reversible, muchos pacientes, tanto adultos como niños, presentan un asma de larga duración desarrollando una marcada restricción del flujo de aire de manera persistente o no completamente reversible. Esta limitación se atribuye a la inflamación y a la remodelación pulmonar (15,27).

A pesar de los esfuerzos por caracterizar al asma en diversos fenotipos, la utilidad es limitada, ya que estos fenotipos se agrupan por características observables sin conexión con el proceso de la enfermedad subyacente (31).

6.1.5. Endotipos del asma

Debido al conocimiento actual sobre la heterogeneidad de esta patología, el concepto del asma como entidad única ahora está obsoleto. El enfoque se ha desplazado hacia la comprensión precisa de las vías moleculares que conducen a la enfermedad.

Se denomina “endotipo” a la vía biológica específica que explica las propiedades observables de un fenotipo (26). Los endotipos del asma se superponen con muchos fenotipos, pero son divergentes en el mecanismo biológico subyacente. La caracterización de los asmáticos por endotipo puede optimizar el manejo e impulsar a terapias personalizadas dirigidas a mecanismos inmunológicos o fisiológicos de la enfermedad (32).

A pesar de las diferencias, en los últimos años ha surgido un consenso sobre subconjuntos específicos, en el que se incluye dos grupos principales: el perfil no T2 y el perfil T2 alto. Estos endotipos se definen en función al nivel de expresión de citoquinas como como las interleucinas (IL) IL-4, la IL-5 y la IL-13, que pueden ser secretadas por las células T cooperadoras clásicas de tipo 2 (Th2), como los linfocitos CD4⁺, o por células inmunitarias no clásicas, como las células linfoides innatas del tipo 2 (ILC-2) (33).

Hasta la fecha no existe una definición establecida del perfil no T2, se define vagamente por la ausencia de marcadores de enfermedad T2 alta (2). Los fundamentos fisiopatológicos del perfil no T2 son todavía un enigma, su pobre comprensión puede estar influenciada por el uso concomitante de corticoesteroides que suprimen la eosinofilia (33). El asma no T2 se ha asociado con la activación de las células Th1 y/o Th17 y en estudios recientes se ha encontrado que el desequilibrio de las células Th17 y T reguladoras pueden desempeñar un papel importante en el asma grave, resistente a esteroides y neutrofílico. Este perfil comprende al asma neutrofílico, mixto o paucigranulocítico (32).

La inflamación T2 comprende al asma eosinofílico y no eosinofílico, ocurre aproximadamente en la mitad de los pacientes con asma, sin embargo, su predominancia en relación con el asma grave es aún controversial (34–36). La

fisiopatología de este perfil comprende una intrincada interconexión entre la inmunidad innata y la adaptativa, en conjunto las células ILC-2 y Th2 expresan el factor de transcripción maestro, GATA3 que orchestra y gobierna la producción de citocinas de tipo 2 (32,37).

El inicio de la respuesta inflamatoria T2 (**Fig.1**) se genera por una perturbación en la barrera epitelial de las vías respiratorias que favorece la traslocación de microorganismos, contaminantes y alérgenos, conduciendo a la liberación de alarminas como la TSLP, IL-33 e IL-25 por parte de las células epiteliales dañadas. La TSLP prepara a las células dendríticas (DCs) para inducir la diferenciación de células T vírgenes en células Th2, posteriormente las células Th2 a través de la IL-4 activan a las células B para diferenciarse en células plasmáticas capaces de generar la IgE necesaria para las respuestas de los mastocitos a los alérgenos. Paralelamente las alarminas pueden activar a las células ILC2, eosinófilos, basófilos y mastocitos. Tanto las células ILC2 activadas, como las células Th2, producen IL-5 e IL-13. La IL-5 promueve la diferenciación y supervivencia de eosinófilos. La IL-13, IL-4 y los mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, leucotrienos, citoquinas, e histamina entre otras, tienen efectos sobre la hiperreactividad de las vías respiratorias, la hipertrofia del músculo liso y la remodelación de las vías respiratorias (32,33), siendo esta última, una característica patológica del asma crónico asociada con la pérdida progresiva de la función pulmonar, pérdida de reversibilidad de la obstrucción y la disminución de la respuesta a la terapia antiinflamatoria (3).

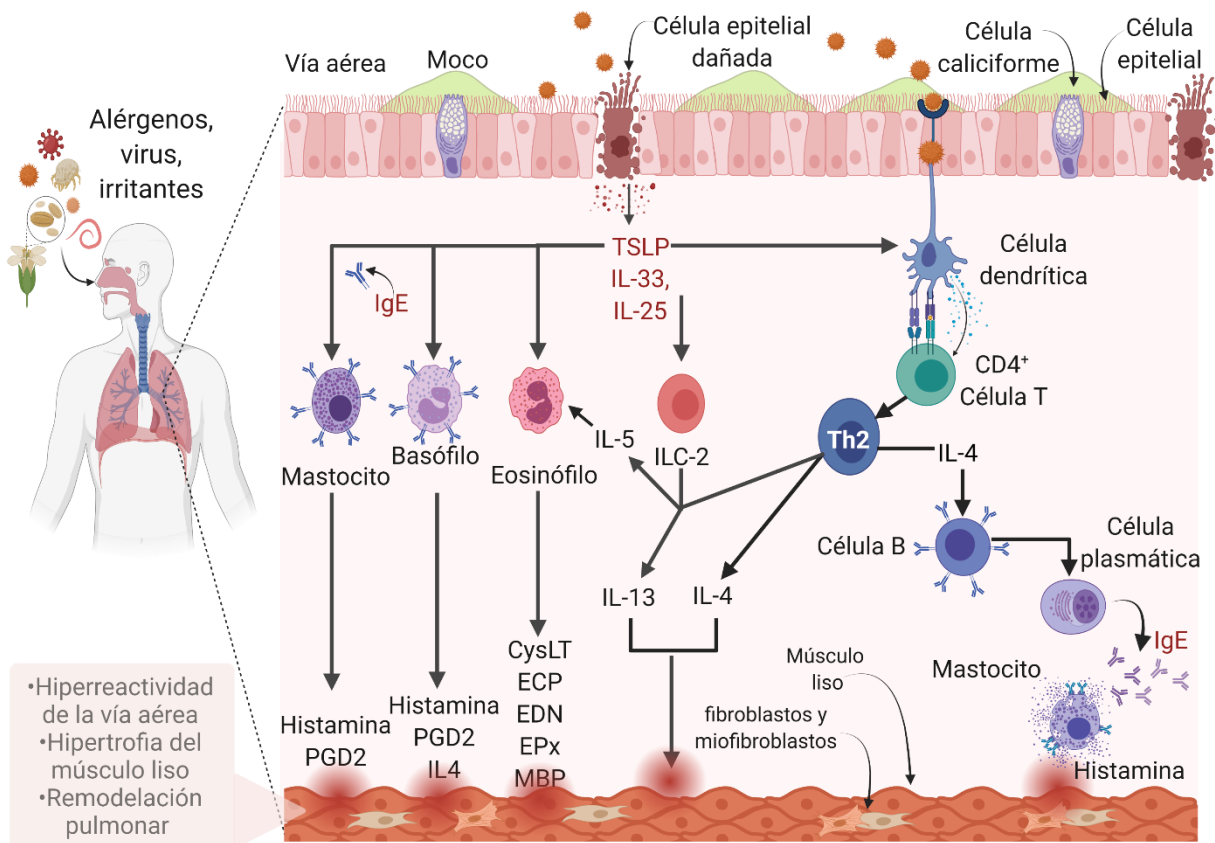


Figura 1. Vía inflamatoria del perfil T2 alto en el asma. La interacción de virus, alérgenos o irritantes con el epitelio de las vías respiratorias da como resultado la liberación de los mediadores linfopoyetina estromal tímica (TSLP), IL-33 e IL-25 por parte de las células epiteliales dañadas. Este proceso conduce a la producción de IL-4, IL-5 e IL-13, que pueden inducir la atracción y activación de basófilos, eosinófilos y mastocitos; secreción de IgE por linfocitos B; y activación de células innatas, lo que resulta en hiperreactividad de la vía aérea, hipertrofia del músculo liso y remodelación pulmonar. TSLP= linfopoyetina estromal tímica; CysLT= cisteinil leucotrienos; ECP= proteína catiónica eosinófila; EDN= neurotoxina derivada de eosinófilos; EPx= peroxidasa de eosinófilos; MBP= proteína básica principal; PGD2= prostaglandina D2. Modificado de (Kuruvilla et al., 2019). Figura creada con biorender.com.

6.1.6. Fisiopatología de la remodelación pulmonar

La remodelación pulmonar se produce como resultado de intentos endógenos aberrantes de reparar el tejido dañado en respuesta a una lesión, lo que lleva a cambios patológicos en la constitución, distribución, espesor, masa o volumen y/o número de componentes estructurales, causando la pérdida de la integridad del tejido

pulmonar y homeostasis alterada de la matriz extracelular (MEC) (38,39), estos cambios están orquestados por la diafonía entre células estructurares y células inmunes dentro de la pared y submucosa de las vías respiratorias. La remodelación de la vía aérea en el asma (**Fig. 2**) se caracteriza por presentar daño epitelial y disfunción ciliar; hiperplasia de las células caliciformes; incremento en la angiogénesis; aumento en el número de miofibroblastos subepiteliales y fibrocitos; activación de fibroblastos; incremento de la masa de músculo liso; así como alteraciones en la producción y degradación de MEC (19).

La MEC es una estructura compleja no celular, tridimensional que está presente en todos los tejidos y es esencial para la vida. Las proteínas de la MEC desempeñan un papel importante en la regulación de muchos procesos, incluido el crecimiento y la migración celular, la organización citoesquelética y el desarrollo tisular (39,40).

La fibrosis subepitelial se define por cambios en la membrana basal y deposición exagerada de proteínas de la MEC, principalmente colágeno tipo I, III y V; proteínas no colágenas, incluidas elastina, tenascina, fibronectina y laminina; que son producidas predominantemente por fibroblastos y miofibroblastos (3).

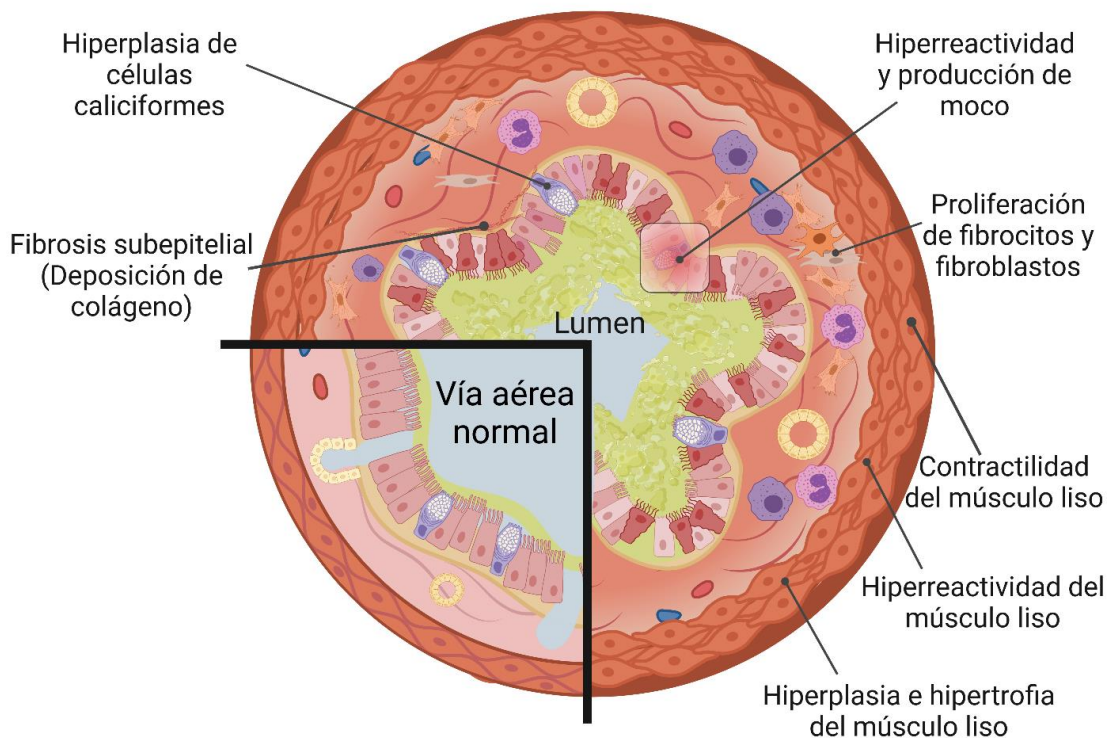


Figura 2. Representación esquemática de la remodelación de la vía aérea. La remodelación de la vía aérea puede explicar la obstrucción persistente del flujo de aire presente en algunos pacientes asmáticos, se caracteriza por presentar fibrosis subepitelial debido al aumento en la deposición de colágeno, hiperplasia de células caliciformes, disminución de la integridad de las células epiteliales que conlleva a una hiperreactividad y producción de moco, aumento en la proliferación de fibrocitos y fibroblastos, incremento en la angiogénesis e hipercontractilidad, hiperreactividad, hipertrofia e hiperplasia del músculo liso. Modificada de (Israel E et al., 2017). Figura creada con biorender.com.

6.1.7. Fibroblastos y remodelación pulmonar

Los fibroblastos son células mesenquimales ubicuas de morfología heterogénea que normalmente se encuentran dispersas por la lámina propia y en la adventicia de los tejidos conectivos de las vías respiratorias, tienen funciones importantes en la reparación tisular siendo estos la principal fuente de producción de MEC (39,41,42). Durante la remodelación pulmonar los fibroblastos se activan y se convierten en miofibroblastos (**Fig. 3**) (39,43), los miofibroblastos son células mesenquimales, que debido a su fenotipo a menudo se describen como una combinación entre fibroblastos y células de músculo liso. Los miofibroblastos son capaces de sintetizar proteínas de la MEC (como los fibroblastos) y poseen la isoforma alfa actina del músculo liso, que es visible en las células como fibras de estrés. Estas características le confieren propiedades contráctiles capaces de generar fuerzas de tracción y participar activamente en la remodelación pulmonar mediante la producción y degradación de la MEC (43–45).

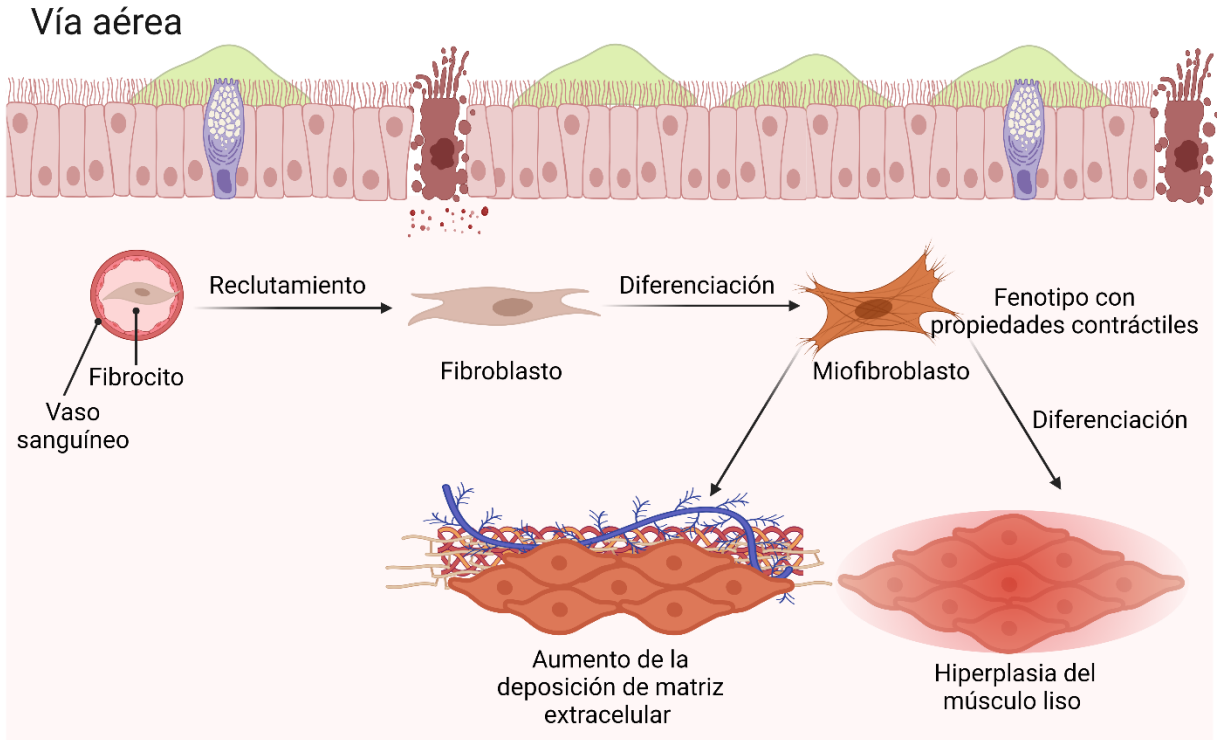


Figura 3. Diferenciación del fibroblasto pulmonar a miofibroblasto y su contribución a la remodelación pulmonar. Los fibroblastos y los fibrocitos son dos estados diferentes de la misma célula, siendo los fibrocitos el estado menos activo. Los fibrocitos son reclutados de la circulación sanguínea para convertirse en fibroblastos, estos, junto con los fibroblastos residentes una vez activados se diferencian a miofibroblastos, células con un fenotipo con propiedades contráctiles capaces de generar fuerzas de tracción y participar activamente en la remodelación pulmonar mediante la producción y degradación de MEC, así mismo, estos miofibroblastos pueden diferenciarse en células de músculo liso y contribuir a la hiperplasia del músculo liso de la vía aérea. Modificada de (Bara et al., 2010). Figura creada con biorender.com

Los fibroblastos pulmonares desempeñan un papel fundamental en la remodelación de las vías aéreas, las funciones celulares que realiza el fibroblasto implicadas en este proceso patológico como la secreción, el metabolismo, la producción de MEC, la diferenciación y la proliferación dependen de la señalización del Ca^{2+} intracelular (46).

6.1.8. Regulación del Ca^{2+} intracelular en fibroblastos

El Ca^{2+} , es un elemento que impacta en casi todos los aspectos de la vida y muerte de una célula, es uno de los iones más importantes y participa como segundo mensajero en la transducción de señales (47).

En la mayor parte de las células en reposo, es decir células no estimuladas, la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se mantiene en niveles muy bajos (~100 - 200 nM) mientras que la concentración de Ca^{2+} extracelular se mantiene en niveles altos (~2 mM). Sin embargo, cuando las células son expuestas a algún tipo de estímulo físico o químico, como la activación de mecano-receptores o la estimulación con un agonista, la ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se incrementa (de aproximadamente 100 nM a 0.1 mM). La ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) puede incrementarse de dos formas, la primera es través de la salida de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y la segunda a través de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. Para que este gradiente, 20.000 veces menor se mantenga, la célula dispone de mecanismos que se encargan de la extrusión de Ca^{2+} del citosol, los principales son: la bomba ATP-asa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (SERCA), la bomba ATP-asa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (**Fig. 4A**) (47,48). Las células invierten gran parte de su energía en mantener los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, bajos, de modo que, pequeños aumentos en la entrada o salida de Ca^{2+} de la membrana plasmática, así como desde la reserva interna pueden desencadenar aumentos rápidos y marcados en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Son estos aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ los que son una señal clave en las respuestas celulares (46).

Dependiendo del tipo de célula, existen dos vías principales de liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, uno es a través de la activación del receptor de rianodina (RyR) y el segundo a través del receptor de inositol trifosfato (IP_3R). La expresión de RyR no se ha detectado en fibroblastos cardíacos humanos o de rata y las oscilaciones de Ca^{2+} observadas no fueron influenciadas por rianodina (49,50), lo que indica que RyR puede no tener un papel directo en los fibroblastos en condiciones fisiológicas y patológicas. En contraste, un estudio realizado en fibroblastos pulmonares conducido por Mukherjee y colaboradores demostró la participación de los RyR en las oscilaciones de Ca^{2+} mediada por el factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF-}\beta$) (51), sin embargo, la activación de IP_3R parece ser la vía principal de

liberación de Ca^{2+} en fibroblastos (46), esta liberación ocurre tras la estimulación de un receptor de membrana acoplado a proteína G (GPCR), que activa a la fosfolipasa C (PLC) y esta a su vez hidroliza un fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) para generar dos segundos mensajeros, el IP_3 y el diacilglicerol (DAG), el IP_3 se une a su receptor localizado en la membrana del retículo endoplásmico (RE) produciendo una liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma (**Fig.4B**) (47).

Por otra parte, el Ca^{2+} extracelular puede ingresar a la célula por medio de una gran variedad de canales iónicos, entre ellos los canales operados por voltaje (VOC) (52) y los canales operados por agonista que a su vez comprenden 3 tipos de canales, 1) los canales operados por receptores (ROC) (53) que son receptores ionotrópicos estimulados por la unión directa del ligando, 2) los canales operados por segundos mensajeros (SMOC), activados por mediadores generados intracelularmente como nucleótidos cíclicos, DAG (54), ácido araquidónico, entre otros y 3) los canales operados por almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC) que son la vía principal de entrada de Ca^{2+} en células no excitables; en el retículo endoplásmico las moléculas de interacción estromal (STIM1,2) actúan como sensores que después de detectar niveles reducidos de Ca^{2+} tras el agotamiento del almacenamiento se multimerizan hasta interactuar funcionalmente con Orai localizada en la membrana plasmática para permitir la entrada de Ca^{2+} a través de los canales operados por almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOCE) (**Fig. 4C**) (55). Para cada uno de estos mecanismos encargados de la homeostasis del Ca^{2+} se han creado herramientas farmacológicas (agonistas y bloqueadores) que ayudan a evaluar la participación de estos actores en la señalización de Ca^{2+} .

Existe una gran variedad de colorantes fluorimétricos, cuyas propiedades de excitación y emisión cambian drásticamente al unirse al Ca^{2+} . Estos colorantes pueden introducirse a las células vivas y por lo tanto permitir la medición de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con alta fidelidad (56).

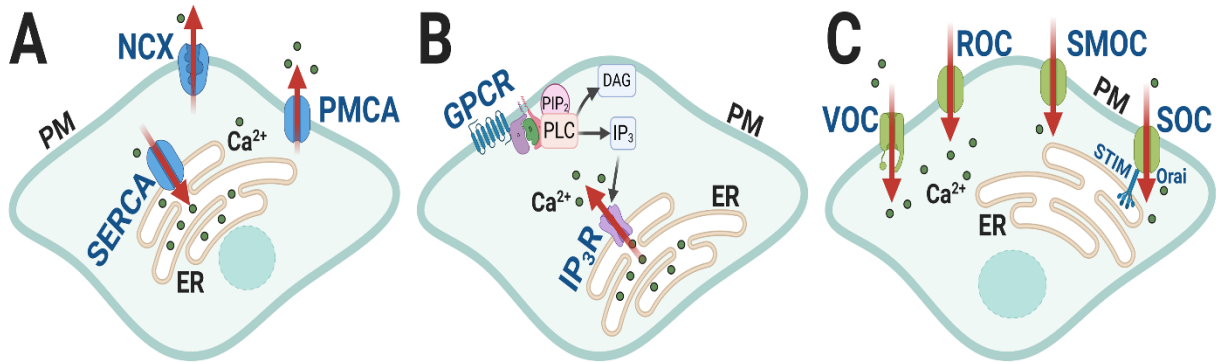


Figura 4. Representación de los posibles mecanismos que regulan la señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares. (A) Se presentan los mecanismos de extrusión de Ca^{2+} del citosol; la PMCA y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) presentes en la membrana plasmática transportan activamente el Ca^{2+} hacia el espacio extracelular, y la bomba ATP-asa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (SERCA) hacia el retículo endoplásmico (RE). (B) Liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares a través de la vía del inositol trifosfato (IP_3); La estimulación de los receptores acoplados a proteína G (GPCR) produce la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en diacilglicerol (DAG) e IP_3 por medio de la fosfolipasa C (PCL). El IP_3 difunde hacia la membrana del RE donde se une a su receptor (IP_3R) e induce la salida de Ca^{2+} del RE. (C) Entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular; La entrada de Ca^{2+} en fibroblastos puede estar mediada por canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC), por canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROC), por canales de Ca^{2+} operados por segundos mensajeros (SMOC) y canales de Ca^{2+} operados por almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC) principalmente. Figura creada con biorender.com.

Diversos estudios han reportado respuestas de Ca^{2+} en poblaciones enteras de fibroblastos pulmonares a una larga lista de agonistas, en los que se incluyen factores de crecimiento como el $\text{TGF-}\beta$ (51,57) y autacoides como bradicinina (58), ATP (59), entre otras (60).

El papel de la señalización de Ca^{2+} en la fisiología de los fibroblastos es de gran interés, particularmente en la fibrosis tisular, donde a menudo faltan tratamientos efectivos (46).

6.1.9. Histamina

La histamina o β -amino-etil-imidazol, producto de la descarboxilación del aminoácido histidina, es un autacoide de corta duración, presente de manera ubicua

en los tejidos de mamíferos a diferentes niveles. Debido a su relevancia médica, la histamina ha sido una de las sustancias más estudiadas de la historia, la mayoría de los avances en el campo se han logrado gracias a grupos de investigación dirigidos por científicos destacados, entre ellos 6 premios Nobel (61). Desde su descubrimiento, hace más de 100 años, se han descrito roles que involucran funciones pleiotrópicas en la salud y en la enfermedad.

Los mastocitos y los basófilos son la fuente principal de histamina, sin embargo, otras células como neuronas, leucocitos, plaquetas, células epiteliales, condrocitos, células tumorales, células parecidas a las enterocromafines, entre otras, también pueden producir histamina; se pueden encontrar concentraciones mucho más altas de histamina en la mucosa intestinal, la piel y los tejidos bronquiales (61–63). La histamina ejerce su actividad a través de 4 receptores, miembros de la superfamilia de receptores GPCR que fueron nombrados cronológicamente en orden de su descubrimiento como receptores de histamina (H₁R-H₄R) (61,64).

El H₁R se expresa ubicuamente en el organismo, en células endoteliales, células nerviosas, células epiteliales, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, DCs y células T y B, está implicado en la inflamación alérgica (por ejemplo, rinitis, asma y enfermedades autoinmunes) (**Fig. 5**) (64), impulsa la migración celular, la nocicepción, la vasodilatación y la broncoconstricción (62,65). La señalización canónica del H₁R involucra el acoplamiento a la proteína G $\alpha_{q/11}$ desencadenando una cascada de señalización que como se mencionó en el capítulo anterior, implica la activación de la PLC, que escinde el PIP₂ en DAG e IP₃, y resulta en una elevación de la [Ca²⁺]_i, además, el DAG activa la proteína quinasa C, que puede fosforilar otras moléculas, alterando así su actividad (**Fig. 6**) (62). Alternativamente se ha descrito la señalización de H₁R a través de la proteína G_{i/o}, activación de la fosfolipasa A2 y producción de guanósín monofosfato cíclico (66), también se ha implicado en la señalización de proteína cinasas activadas por mitógenos y la acumulación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), lo que conduce a una mayor expresión de genes proinflamatorios (64).

El receptor de histamina tipo 2 (H₂R) se expresa en gran medida en diversas células y tejidos, como las células B, células T, DCs, células parietales gástricas, células del músculo liso, células endoteliales, epiteliales y hepatocitos (62,64); la activación del receptor puede inducir la producción de moco en las vías respiratorias, la permeabilidad vascular y la secreción de ácido gástrico (**Fig. 5**) (62). La histamina actúa sobre el H₂R a través del acoplamiento a la proteína G α_s que activa a la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), la activación resultante de la PKA produce la fosforilación de algunas proteínas (**Fig. 6**) (62,65). Se ha descrito que en algunas células el H₂R no solo se acopla a las proteínas G α_s sino que también a las proteínas G $\alpha_{q/11}$ lo que produce una elevación de la [Ca²⁺]_i tras su estimulación (65).

El receptor de histamina tipo 3 (H₃R) se expresa principalmente, en neuronas histaminérgicas, monocitos y eosinófilos, se ha descrito que juega un papel importante en las enfermedades neuroinflamatorias ya que participa en la liberación de histamina y otros neurotransmisores, tiene un rol importante en la regulación homeostática de los niveles de energía, el ciclo de sueño-vigilia, cognición e inflamación (**Fig. 5**) (62,64).

El receptor de histamina tipo 4 (H₄R), es el receptor de histamina descubierto más recientemente, se expresa preferentemente en eosinófilos, DCs, células de Langerhans, células T, basófilos, y mastocitos, participa en la inmunomodulación mediante la migración celular y la respuesta alérgica de las células inmunes (**Fig. 5**) (64,67,68). Tanto el H₃R como el H₄R se encuentran acoplados a una proteína G α_i cuya función es inhibir la formación de cAMP y disminuir la actividad de la PKA (**Fig. 6**). El H₄R y H₃R movilizan Ca²⁺ citosólico a través de un mecanismo que implica la activación de la PLC por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G α_i (64,65), un estudio publicado recientemente demostró que paradigmáticamente para que este mecanismo ocurra, es necesaria la activación de la proteína G α_q (69).

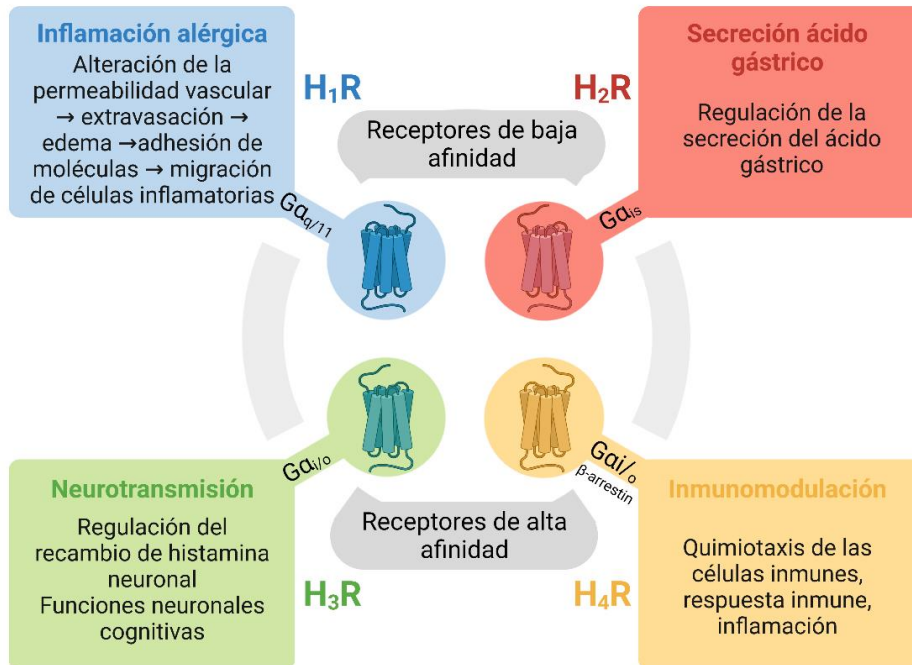


Figura 5. Panorama general de las funciones principales de los receptores de histamina. La interacción de la histamina con sus receptores provoca una gran variedad de efectos biológicos, el H₁R y H₂R son receptores de baja afinidad, el H₁R participa en la inflamación alérgica, el H₂R tiene una participación importante en la secreción de ácido gástrico, producción de moco y permeabilidad vascular. El H₃R y H₄R, receptores de alta afinidad, tienen un papel importante en la neurotransmisión e inmunomodulación. Figura creada con biorender.com.

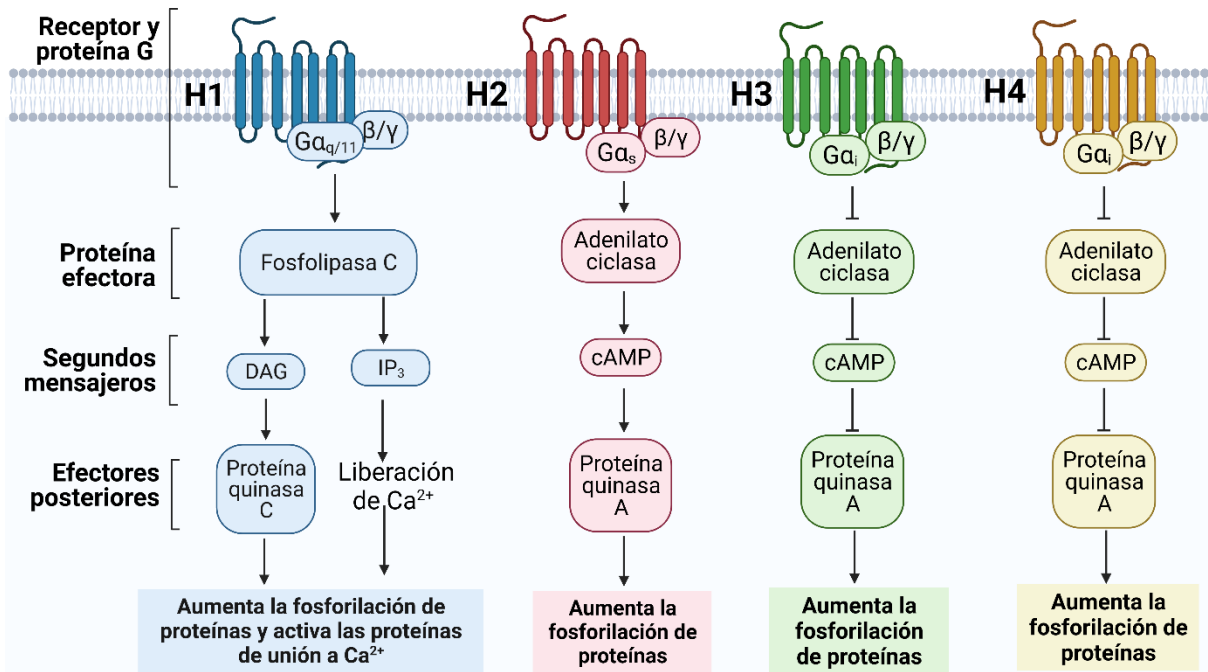


Figura 6. Cascada de señalización canónica para cada receptor histamínico. Los efectos pleiotrópicos de la histamina están mediados por cuatro receptores de histamina acoplados a proteínas G. La señalización de H₁R a través de $G_{\alpha q/11}$ conduce a la activación de la PLC, producción de IP_3 y DAG, liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares y activación de la proteína quinasa C. La señalización del H₂R acoplado a la proteína $G_{\alpha s}$ actúa mediante la activación del adenilato ciclasa, que aumenta los niveles de cAMP y activa la PKA, mientras que H₃R y H₄R ambos acoplados a proteínas $G_{\alpha i}$ inhiben esta cascada. Esas vías de señalización intracelular culminan en la fosforilación de diversas proteínas. Figura creada con biorender.com.

7. Antecedentes específicos

La histamina, ha sido un mediador bioquímico ampliamente reconocido, liberado por los mastocitos y se ha pensado que tiene un papel fundamental en la fisiopatología del asma (7). Tomioka y colaboradores estimaron que el número de mastocitos y la concentración de histamina en líquido de lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos era mayor que el de los sujetos sanos (70), en adición, Carroll y colaboradores demostraron que la desgranulación de los mastocitos está relacionada con la gravedad del asma (71). Salomonsson y colaboradores recientemente reportaron que los niveles elevados de progenitores de mastocitos circulantes están relacionados con la función pulmonar reducida en pacientes asmáticos (72).

Por otra parte, Jordana y colaboradores reportaron que la histamina aumentó la proliferación de fibroblastos pulmonares de una manera dependiente de la concentración (73), así mismo, un estudio conducido por Kohyama y colaboradores demostró que la histamina tiene el potencial de estimular la migración de fibroblastos pulmonares humanos a través de H₄R y, por lo tanto, puede contribuir al desarrollo de trastornos fibróticos del pulmón (74).

Experimentos realizados por Bernabé Romano en 2012 en nuestro laboratorio demostraron que la histamina genera una señal de Ca²⁺ de manera concentración dependiente, mediante la activación de H₁R en fibroblastos de pulmón humano extraídos de donantes cadavéricos (8). En 2014 Horie y colaboradores demostraron el efecto contráctil, concentración-dependiente, de la histamina en fibroblastos de pulmón humano. Sus hallazgos sugieren que la histamina podría estar involucrada en la remodelación de las vías respiratorias en el asma a través de su acción sobre receptores H₁R (9). Mientras que varios estudios se enfocan en el efecto de la histamina en la señalización de Ca²⁺ sobre las células del músculo liso y miofibroblastos como determinante importante de contractilidad e hiperreactividad bronquial en el asma (75–80). A pesar de la evidente relación entre histamina, [Ca²⁺]_i, fibroblastos y remodelación pulmonar, a la fecha, hasta donde nosotros conocemos, únicamente existe esa información acerca del efecto que genera la histamina en la señalización de [Ca²⁺]_i sobre fibroblastos de pulmón humano, aún continúan sin dilucidarse los mecanismos moleculares que dan inicio al aumento de la [Ca²⁺]_i, así como el papel de otros canales que participan en la homeostasis del Ca²⁺, por lo que, se necesitan más experimentos para corroborar y ampliar el conocimiento.

8. Justificación

El asma es una de las enfermedades crónicas no transmisibles más comunes, que afecta tanto a niños como adultos, su etiología se atribuye a factores genéticos, susceptibilidad del huésped y exposiciones ambientales. A pesar del creciente campo de investigación en la comprensión de la patogénesis de esta enfermedad y el conocimiento de la relación que existe entre asma, histamina y remodelación pulmonar, aún continúan sin resolverse los mecanismos moleculares subyacentes. Se

ha descrito en la literatura que el fibroblasto es un elemento clave para la comprensión de la fisiopatología del asma. Los resultados obtenidos en la presente tesis contribuyen a la caracterización de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano con el fin de aportar al conocimiento y posteriormente impactar a largo plazo en el desarrollo de nuevos posibles abordajes terapéuticos.

9. Planteamiento del problema

El asma es un problema importante de salud pública presenta una alta morbilidad teniendo un alto impacto en la calidad de vida de los que la padecen, afecta a más de 300 millones de personas alrededor del mundo, se especula que en el 2025 afectará a 400 millones de personas. Datos epidemiológicos indican que en México la prevalencia de asma diagnosticada en adultos oscila cerca del 3-6%, y en niños del 8-12.7%. Existen trabajos que han demostrado que la histamina ejerce un rol fundamental en la activación de fibroblastos, así como el aumento de la deposición de la matriz extracelular, procesos implicados en la fisiopatología del asma. Sin embargo, hasta ahora se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales la histamina ejerce sus efectos sobre los fibroblastos. Los resultados obtenidos podrían ayudar a dilucidar dichos procesos moleculares. Por lo que nos generamos la siguiente pregunta de investigación.

¿Cuáles son los efectos que causa la histamina en la señalización de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano?

10. Hipótesis Científica

La histamina genera una señal de Ca^{2+} a través de la estimulación de receptores histaminérgicos, posteriormente promueve la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, así como la entrada capacitativa de Ca^{2+} del medio extracelular en fibroblastos de pulmón humano.

11. Objetivos

11.1. Objetivo General

Caracterizar la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38.

11.2. Objetivos Particulares

- I. Examinar el efecto concentración dependiente de la histamina sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38.
- II. Evaluar la participación del Ca^{2+} extracelular sobre la señal de Ca^{2+} evocada por histamina.
- III. Evaluar la señal de Ca^{2+} evocada por histamina sobre los diferentes tipos de receptores histaminérgicos.
- IV. Evaluar el papel de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} sobre la señal de Ca^{2+} evocada por histamina.
- V. Evaluar el papel de los canales de Ca^{2+} operados por almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC) en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina
- VI. Evaluar el efecto de la histamina sobre los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC).

12. Material y métodos

12.1. Diseño del estudio

Por su objetivo	Por su asignación	Por su temporalidad	Por la recolección de datos	Por la conformación de grupos
Comparativo	Experimental	Transversal	Prolectivo	Homodémico

Tabla 1. Diseño del estudio.

12.2. Ubicación espaciotemporal

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de fisiología cardiovascular de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

12.3. Muestreo

12.3.1. Definición de la unidad de población

En esta tesis se emplearon fibroblastos de pulmón fetal humano de la línea celular WI-38.

12.3.2. Criterios de selección de las unidades de muestreo

12.3.2.1. Criterios de inclusión

Se consideraron células viables a fibroblastos de pasajes 5-10.

12.3.2.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos fibroblastos que no alcanzaron el 75% de su confluencia en el tiempo estipulado.

12.3.2.3. Criterios de eliminación

Se eliminaron las células que en reposo (células no estimuladas) presentaron variaciones considerables en la $[Ca^{2+}]_i$.

12.4. Definición de las variables y escalas de medición

Las variables estudiadas en este trabajo de investigación se describen en la **tabla 2** y se ejemplifican en la **figura 7**.

Variables dependientes: concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), Basal, Amplitud del pico, Meseta, Oscilaciones.

Variable independiente: Histamina

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Escala de medición	Instrumento de medición	Unidad de medición
Concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$)	El Ca^{2+} es un catión con capacidad multifuncional como segundo mensajero	Intensidad de fluorescencia por área	Cuantitativa continua	Microscopio de fluorescencia y software especializado	Intensidad de fluorescencia (Unidades arbitrarias)
Basal de $[Ca^{2+}]_i$	Es el nivel de $[Ca^{2+}]_i$ en células no estimuladas	Niveles de fluorescencia iniciales, previos a la estimulación del agonista.	Cuantitativa continua	Microscopio de fluorescencia y software especializado	Intensidad de fluorescencia (Unidades arbitrarias)
Amplitud del pico	Es la diferencia entre el punto más alejado y el punto medio o de equilibrio.	Diferencia entre el punto más alto de fluorescencia y el valor basal de Ca^{2+} que se obtiene al estimular a los fibroblastos con agonistas histaminérgicos	Cuantitativa continua	Microscopio de fluorescencia y software especializado	Intensidad de fluorescencia (Unidades arbitrarias)
Meseta	Fase donde el valor se	Incremento en la	Cuantitativa continua	Microscopio de	Intensidad de fluorescencia

	mantiene constante por un periodo de tiempo definido.	fluorescencia por arriba de los niveles basales de Ca^{2+} que se mantiene constante después del pico inicial de Ca^{2+} generado por el agonista		fluorescencia y software especializado	(Unidades arbitrarias)
Oscilaciones	Se conoce como oscilación, a un movimiento periódico entre dos puntos.	Incremento en la fluorescencia por encima de los niveles basales de Ca^{2+} de manera cíclica.	Cuantitativa continua	Microscopio de fluorescencia y software especializado	Intensidad de fluorescencia (Unidades arbitrarias)
Histamina	Amina imidazólica involucrada en procesos fisiológicos y fisiopatológicos como el asma.	Logaritmo de la concentración molar	Cuantitativa continua	La histamina se pesa en una balanza analítica y se realizan las soluciones correspondientes	Fracción molar

Tabla 2. Definición de las variables y escalas de medición.

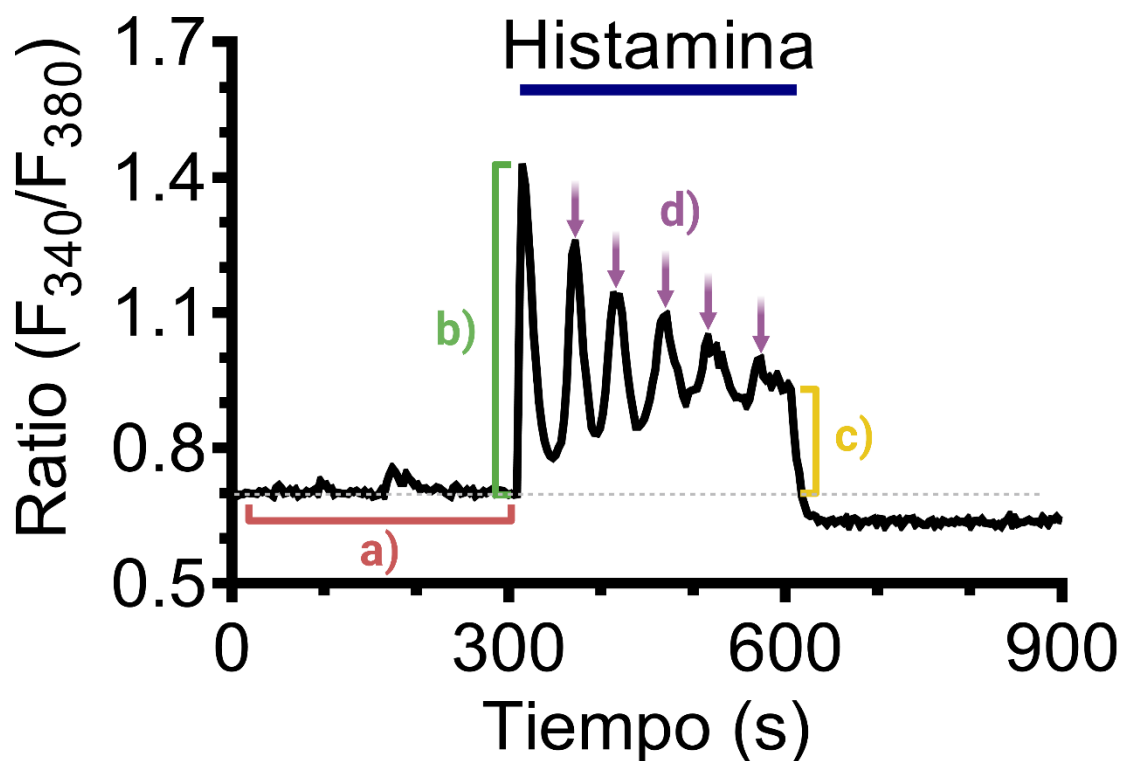


Figura 7. Variables de medición de los registros de Ca^{2+} intracelular en fibroblastos WI-38. Se presentan las variables evaluadas para cada registro de Ca^{2+} obtenido en cada uno de los objetivos planteados. **a)** Basal, valor que corresponde a los niveles de Ca^{2+} previos a la estimulación. **b)** Amplitud del pico, valor máximo de la fluorescencia con respecto al nivel basal inicial que se obtiene al estimular a las células con histamina. **c)** Amplitud de la meseta, definido como el valor de fluorescencia que continúa al pico y se mantiene de manera constante con respecto al Ca^{2+} basal. Finalmente se evaluó **d)** la presencia de oscilaciones que son incrementos de fluorescencia por arriba de la línea basal de manera periódica.

12.5. Técnicas y procedimientos

12.5.1. Cultivo celular

Las líneas celulares de fibroblastos de pulmón fetal humano se adquirieron de la empresa American Type Culture Collection, Colección WI-38 (ATCC® CCL-75™) y se cultivaron hasta lograr una confluencia del 75% en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% a 37°C en una atmósfera de O_2 al 95% y CO_2 al 5%. Los fibroblastos de los pasajes de 5-10 se sembraron en cubreobjetos durante 24

horas y luego se incubaron durante 48 horas en medio desprovisto de suero. Los procedimientos se realizaron de acuerdo a la norma oficial mexicana descrita en “Leyes y Códigos de México, de la Ley General de Salud en Materia de Investigación”, a la norma oficial mexicana NOM-065-SSA1-1993, que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo, así como a las directrices internacionales para el uso de líneas celulares en la investigación biomédica (81).

12.5.2. Soluciones fisiológicas

Para este estudio se empleó la solución salina fisiológica por sus siglas en inglés (PSS) con la siguiente composición (en mM) 150 NaCl, 6 KCL, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucosa, 10 HEPES.

Para obtener solución salina fisiológica libre de Ca²⁺ (\emptyset Ca²⁺) se sustituyó Ca²⁺ con NaCl 2 mM y se añadió EGTA 0.5 mM, como quelante de Ca²⁺.

La osmolaridad se midió con un osmómetro (Wescor 5500, Logan, UT, EE. UU.) las soluciones se ajustaron a un pH de 7.4 con NaOH.

12.5.3. Medición de la [Ca²⁺]_i

La técnica de medición de Ca²⁺ en fibroblastos ha sido descrita previamente por Berra-Romani y Cols. (**Fig. 8**) (82), y se explica detalladamente a continuación.

Los fibroblastos adheridos a los cubreobjetos se lavaron dos veces PSS y se incubaron con 3 μ M de Fura-2 acetoximetil éster (Fura 2-AM) en PSS durante 30 minutos a temperatura ambiente (21-23°C). Las células se incubaron durante 30 minutos en PSS libre de Fura 2-AM. Los cubreobjetos se lavaron y se fijaron al fondo de una placa Petri usando una gota de silicón. La placa Petri se montó en una platina del microscopio Axiolab de epifluorescencia vertical (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), provisto de una lámpara de mercurio de 100 W (OSRAM HBO 50). Para visualizar a los fibroblastos se utilizó un objetivo Zeiss X63 Achromat (de inmersión en agua, distancia de trabajo de 2,0 mm, apertura numérica de 0,9). Las células se excitaron alternadamente a 340 y 380 nm, para ello se empleó una rueda gira filtros provista de un obturador (Lambda 10, Sutter Instrument, Novato, CA, EE. UU.) la luz emitida se detectó a 510 nm. La señal de Ca²⁺ fue medida en fibroblastos individuales, utilizando un software que permite delimitar a cada célula dibujando sobre las

imágenes adquiridas una región de interés. Para controlar la cámara (Extended-ISIS Camera, Photonic Science, Millham, Reino Unido), la rueda gira filtros, así como trazar las regiones de interés de la señal fluorescente a medir, se empleó un software personalizado, previamente validado, que funciona en entorno LINUX. La medición de la señal se captó cada 3 segundos y las imágenes obtenidas se almacenaron en un disco duro para posteriormente convertirse en imágenes de ratio 340/380 mediante el software ImageJ (National Institutes of Health, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (21-23°C). Todos los experimentos se realizaron por triplicado utilizando 3 pases diferentes de fibroblastos para cada una de las condiciones.

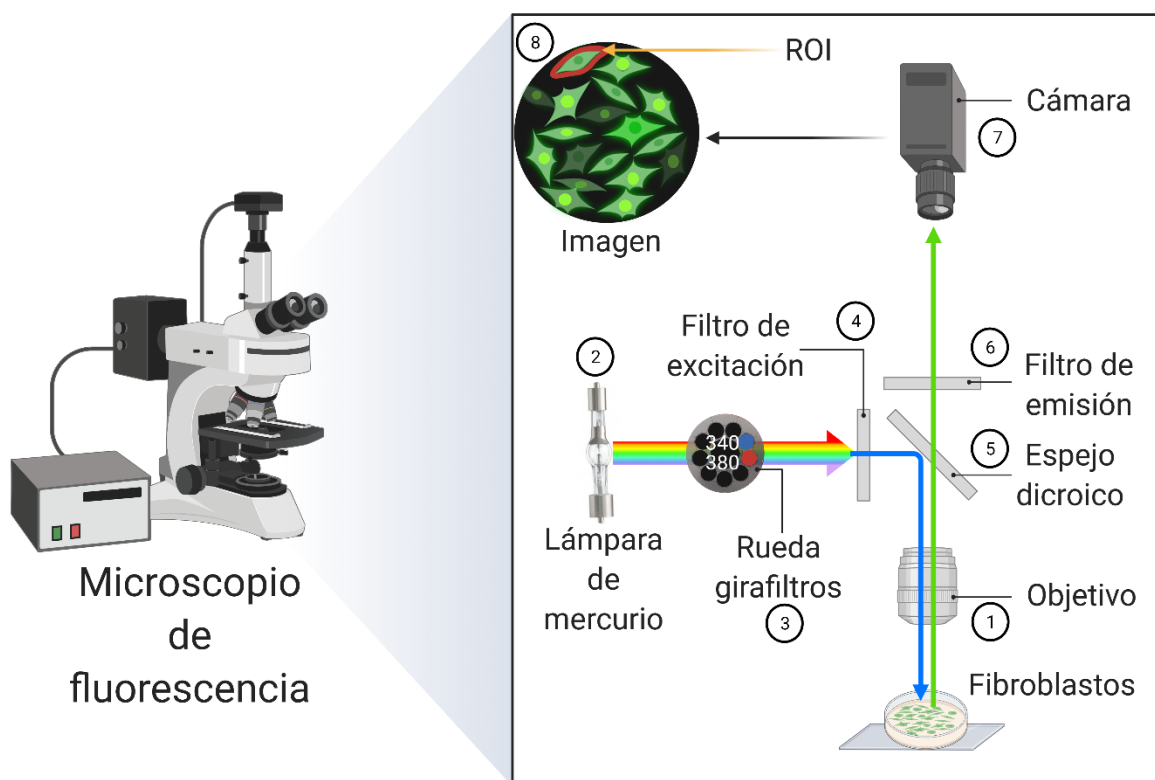


Figura 8. Esquematación de la medición de Ca^{2+} intracelular. (1) Se colocó a los fibroblastos bajo el objetivo de inmersión en solución PSS. (2) El suministro de luz, es una lámpara de mercurio que emite un haz de luz atravesando los filtros 340 y 380 nm de manera alternada, los cuales se encuentran acoplados a (3) una rueda gira-filtros conducido por una computadora. (4). La luz que se filtra se dirige a un filtro de excitación, choca sobre (5) un espejo dicróico que conduce el haz de luz hacia las células. (4). La luz emitida por los fibroblastos atraviesa el espejo dicróico

hasta llegar al **(6)** filtro de emisión (510 nm) donde nuevamente se filtra la luz para enviarla a la cámara de alta sensibilidad **(7)**. La imagen es capturada cada tres segundos para cada filtro por la cámara **(8)** Las imágenes obtenidas se almacenan para su posterior análisis. ROI= región de interés. Figura creada con biorender.com.

12.6. Procedimiento experimental por objetivos

El intercambio de medio y la administración de agonistas, antagonistas y antihistamínicos se llevó a cabo retirando el medio de baño (2 ml) mediante una bomba de succión y posteriormente añadiendo la solución deseada.

Objetivo 1. Se aplicó a los fibroblastos de pulmón humano concentraciones crecientes de histamina, seguidas cada una de las aplicaciones por un periodo de lavado con PSS. Se registraron los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones basales, (control negativo) y se cuantificó la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina (control positivo). Se graficó en función del logaritmo natural de la concentración de histamina aplicada.

Objetivo 2. Se aplicó a los fibroblastos de pulmón humano histamina (300 μ M), en $\emptyset Ca^{2+}$. Se comparó la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en ausencia (control negativo) y presencia de Ca^{2+} extracelular (control positivo).

Objetivo 3. Los fibroblastos fueron preincubaron durante 10 minutos con los antihistamínicos de los H_1R - H_4R y en la continua presencia de los antihistamínicos se aplicó la concentración máxima de histamina. Se empleó Pyrilamine (10 μ M) como antihistamínico de los H_1R , para el H_2R Ranitidine (50 μ M), para el H_3R Clobenpropit (10 μ M) y para el H_4R JNJ7777120 (10 μ M). Se comparó la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en presencia de los antihistamínicos (control positivo) y la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en PSS (control negativo).

Objetivo 4. Los almacenes de Ca^{2+} se vaciaron con un inhibidor selectivo de la SERCA, el ácido ciclopiazónico (10 μ M), en $\emptyset Ca^{2+}$. Se comparó la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en condiciones normales (control negativo) con la obtenida después de vaciar los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (control positivo).

Objetivo 5. Para evaluar la participación de los SOC se empleó dos bloqueadores inespecíficos, lantano (La^{3+}) (10 μ M) y gadolinio (Gd^{3+}) (10 μ M). La

amplitud de la histamina en condiciones normales (control negativo) se comparó con la obtenida en presencia de los bloqueadores (control positivo).

Objetivo 6 Para estudiar el papel que juegan los VOC se utilizó el bloqueador específico, nifedipina (1 μ M), y el bloqueador no específico Ni²⁺ (100 μ M), los cuales se incubaron durante 10 minutos antes de la aplicación de la concentración máxima de histamina. Se comparó la amplitud de la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en ausencia (control negativo) y presencia de los bloqueadores específicos de los VOC (control positivo).

12.7. Análisis de datos

Para la adquisición de los valores de fluorescencia, se empleó el programa ImageJ, para graficar y realizar el análisis estadístico de resultados se utilizaron los programas Origin Pro 2021 y GraphPad Prism 8.0.

12.8. Diseño estadístico

Los datos se expresaron como media \pm error estándar (EE). Los datos no gaussianos, identificados mediante la prueba de normalidad omnibus de D'Agostino y Pearson ($p \leq 0.05$) se analizaron estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para dos grupos y Kruskal-Wallis para más de dos grupos. Para datos normales se utilizó una prueba t de Student no apareada para dos grupos y ANOVA para más de dos grupos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

Los datos de concentración-respuesta a histamina se ajustaron mediante la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{100}{1 + \frac{EC_{50}}{[Histamina]}} \quad (1)$$

donde Y es la respuesta (relativa a la amplitud transitoria de Ca²⁺), [Histamina] es la concentración de histamina y la concentración efectiva media máxima (EC50) es la [Histamina] que indujo el 50% de la respuesta máxima.

13. Logística

13.1. Recursos humanos

El siguiente proyecto se llevó a cabo por la tesista Verónica Ajelet Vargaz Guadarrama bajo la mentoría del D.C. Roberto Berra Romani y la codirección del D.C. Mario García Carrasco.

13.2. Recursos materiales y financieros

Se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Cardiovascular de la Facultad de Medicina de la BUAP bajo el financiamiento de la BUAP.

14. Resultados

14.1. La histamina causa una señal de Ca^{2+} heterogénea en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38.

Mediante el uso de imágenes digitales de fluorescencia con Fura-2 AM, se monitoreó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de manera simultánea en varios fibroblastos individuales de la misma población. La aplicación de histamina (300 μM), incluso en células del mismo campo microscópico, provocó señales de Ca^{2+} de morfología heterogénea, que se clasificaron en 4 patrones diferentes: el primero consistió en un aumento rápido y transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, llamado **pico** (59/306 células, 19.28%, **Fig. 9A**), el segundo en un pico seguido de incrementos y disminuciones cíclicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ denominado **pico-oscilaciones** (198/306 células, 64.70%, **Fig. 9B**), el tercero en un pico con oscilaciones y un aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ denominado **pico-meseta-oscilaciones** (41/306 células, 13.39%, **Fig. 9C**) y por último, el cuarto patrón que fue el menos frecuente, consistió en un pico acompañado de una meseta, al cual se le denominó **pico-meseta** (2/306 células, 0.65 %, **Fig. 9D**). Únicamente el 1.96% (6/306 células) de los fibroblastos no respondió a histamina 300 μM .

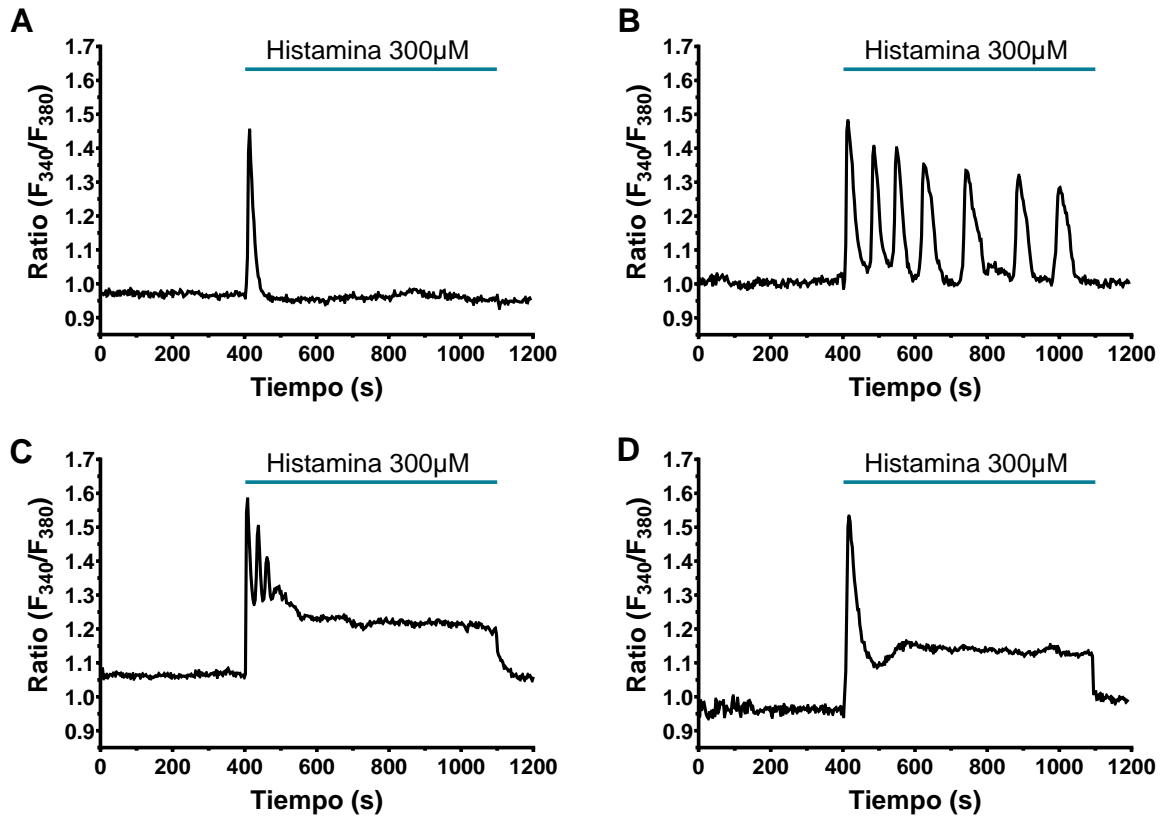


Figura 9. Heterogeneidad en la respuesta de Ca^{2+} provocada por histamina en fibroblastos WI-38. La aplicación de histamina ($300 \mu\text{M}$) provocó diferentes patrones de señales de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón cargados con Fura-2 AM. La señal de Ca^{2+} intracelular consistió en **A)** un pico rápido de Ca^{2+} (**pico**) (19.28 % de las células analizadas) que podría ser seguido por **B)** oscilaciones de Ca^{2+} (64.70%) (**pico-oscilaciones**), **C)** meseta sostenida, superpuesta por oscilaciones de Ca^{2+} (13.39%) (**pico-meseta-oscilaciones**) o **D)** únicamente una meseta (0.65 %) (**pico-meseta**). En esta y en las siguientes figuras, se añadió histamina en el momento indicado por la barra horizontal dibujada sobre los registros de la señal de Ca^{2+} .

Con la finalidad de saber si el patrón de la señal de Ca^{2+} y el número de oscilaciones presentes, son dependientes de la concentración de histamina utilizada, se cuantificó la frecuencia de cada una de las distintas morfologías de los transientes de Ca^{2+} (**Fig. 10A**) y el número de oscilaciones presentes en los primeros 400 segundos de la señal de Ca^{2+} (**Fig. 10B**) para cada concentración de histamina utilizada (100 nM – 1mM). Los datos indican que el patrón de pico (**Fig. 9A**) se visualiza principalmente cuando los fibroblastos son estimulados

con concentraciones de histamina bajas (100 y 300 nM), mientras que el patrón pico-oscilaciones (**Fig. 9B**) se observan con mayor frecuencia, a medida que se aumenta la concentración de histamina (1 μ M-1 mM).

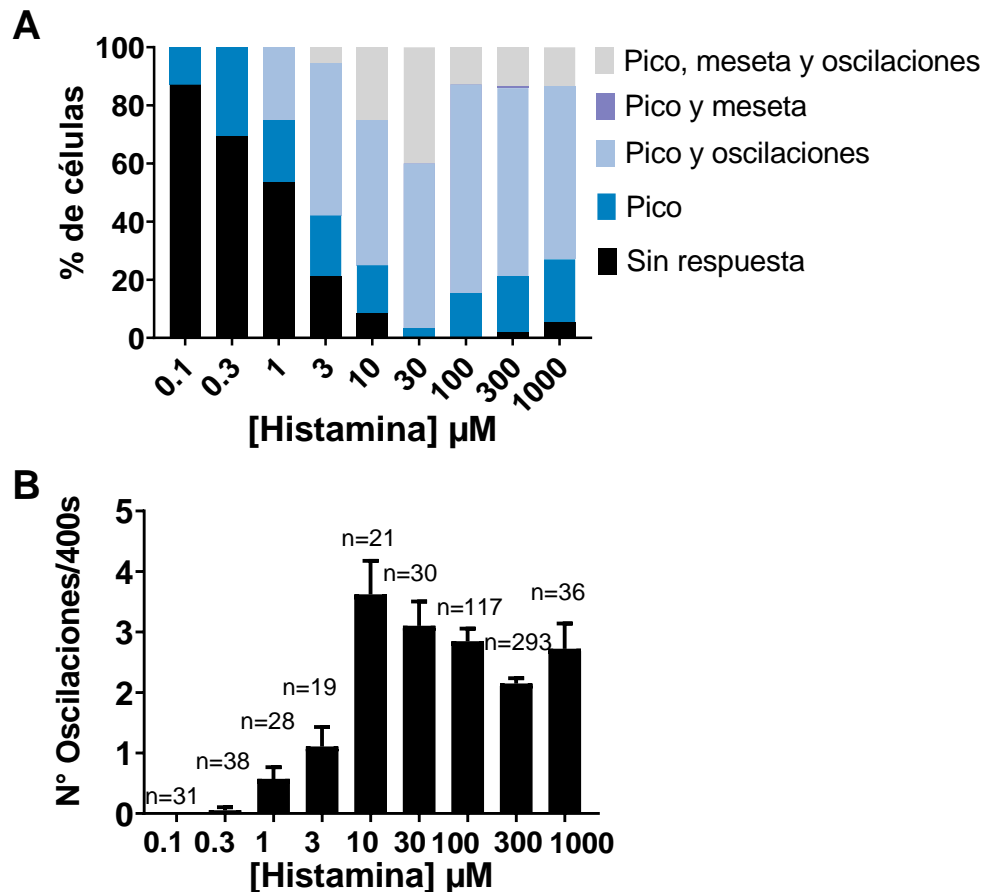


Figura 10. La histamina a distintas concentraciones provocó diferentes patrones y número de oscilaciones en la señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares WI-38. A) Porcentaje de células para cada patrón de respuesta evocada por las diferentes concentraciones de histamina (100 nM–1 mM). **B)** Media \pm EE del número de oscilaciones presentes en los primeros 400 segundos para cada una de las concentraciones de histamina (100 nM–1 mM). La “n” representa el número de células estudiadas.

14.2. La histamina genera una señal de Ca^{2+} de manera concentración-dependiente en fibroblastos WI-38.

La aplicación no acumulativa de concentraciones crecientes de histamina (100 nM-1 mM) en fibroblastos cargados con Fura-2 AM se representó como una curva

concentración-respuesta, al analizar la curva, se observa que presenta una forma sigmoidea, en donde el incremento de la concentración de histamina produce un aumento en la amplitud de la respuesta inicial (pico) de la señal de Ca^{2+} (**Fig. 11A**, círculos negros), esto permitió determinar la concentración umbral (100 nM), la concentración máxima (300 μM) y la $\text{EC}_{50}= 5.494 \mu\text{M}$. Así mismo, en las células que presentaron un patrón de señal de Ca^{2+} con meseta, la amplitud de la meseta también presentó una relación concentración-respuesta (**Fig. 11A**, triángulos azules). Para este parámetro la $\text{EC}_{50}= 5.494 \mu\text{M}$. En la **Fig. 11B** se presentan los registros típicos para cada concentración de histamina empleada en la curva concentración-respuesta.

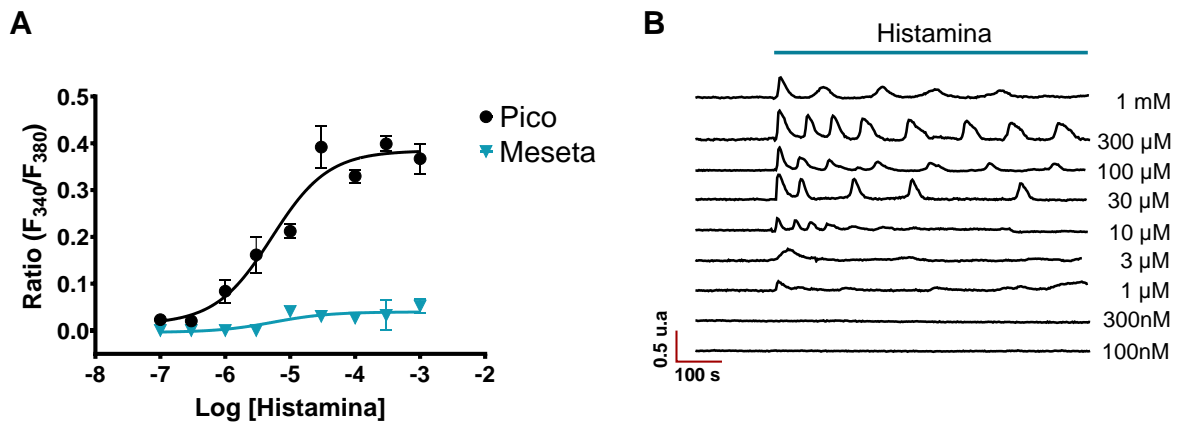


Figura 11. Efecto concentración-dependiente de la histamina sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano WI-38. A) Curva concentración-respuesta no acumulativa de la media \pm EE de la amplitud del pico (círculos negros) y meseta (triángulos azules) de la señal de Ca^{2+} en función de la concentración de histamina en fibroblastos WI-38. Coeficiente de determinación, $R^2=0.9573$ para la curva de amplitud del pico y $R^2= 0.7764$ para la curva de amplitud de la meseta. Los datos experimentales de amplitud del pico y amplitud de la meseta fueron ajustados a una curva concentración-respuesta (línea negra y azul respectivamente), utilizando la ecuación matemática (1) descrita en la sección 12.8. Cada punto representa la media \pm EE de al menos 19 células B) Registros típicos para cada concentración de histamina utilizada en la curva concentración-respuesta. La línea basal de los registros de Ca^{2+} se modificó con fines de representación para evitar su sobreposición.

14.3. Desensibilización de la señal de Ca^{2+} , por la repetida estimulación de los fibroblastos de pulmón humano con histamina.

En la **Figura 12A**, se muestra que la aplicación consecutiva de la misma concentración de histamina ($300 \mu\text{M}$) después de un lavado con PSS en una misma célula provocó una respuesta similar a la anterior con una disminución en la amplitud del pico, amplitud de la meseta (**Fig. 12B**) y número de oscilaciones en la señal de Ca^{2+} (**Fig. 12C**). Estos datos sugieren que la aplicación de concentraciones máximas de histamina ($300 \mu\text{M}$) en un mismo fibroblasto genera desensibilización del receptor. La desensibilización homóloga es una característica de los GPCR.

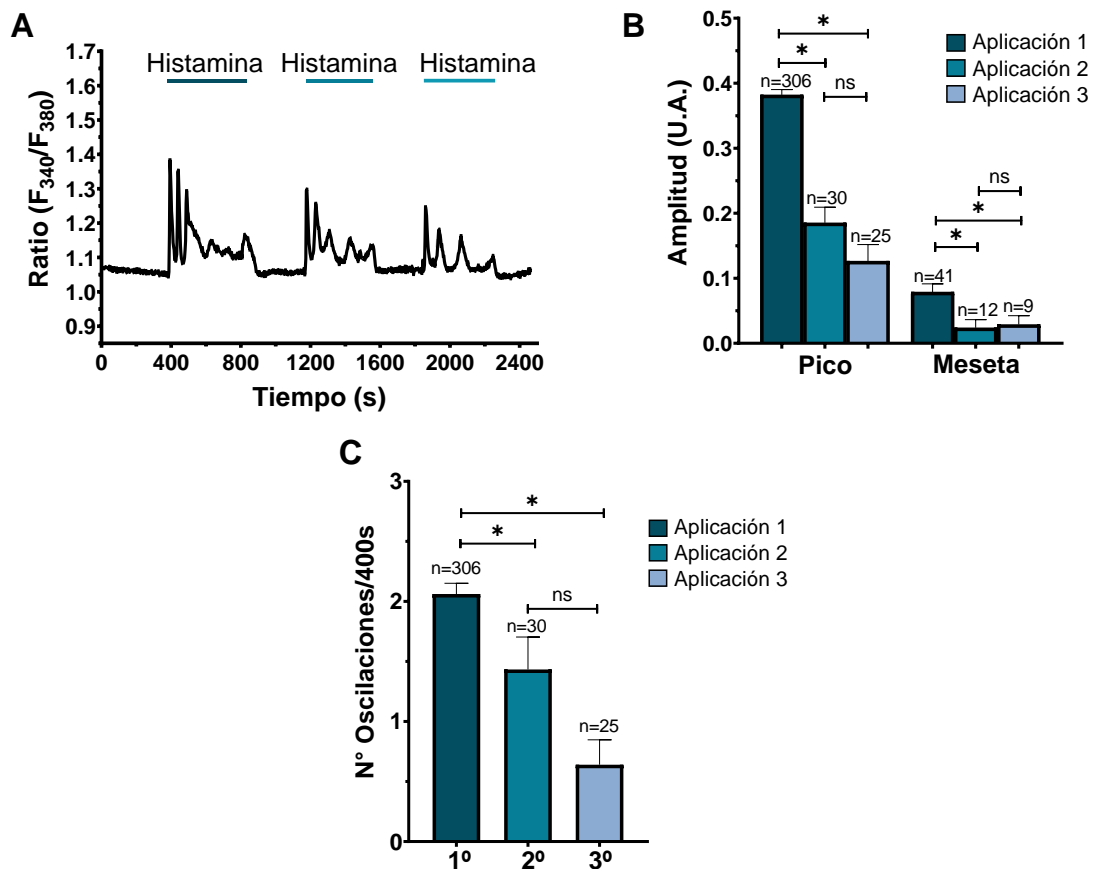


Figura 12. Efecto de la aplicación consecutiva de histamina $300 \mu\text{M}$ sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano WI-38. A) Registro representativo de la triple aplicación de histamina ($300 \mu\text{M}$) en una célula, antecedidas por un lavado con PSS. **B)** Media \pm EE de amplitud del pico y amplitud de la meseta del transiente de Ca^{2+} evocado por 3 aplicaciones consecutivas de histamina. **C)** Media \pm EE del número de oscilaciones presentadas en los primeros 400 segundos para cada una

de las aplicaciones. La “n” representa el número de células estudiadas. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba Kruskal-Wallis (* = $p \leq 0.05$), (ns= no significativo).

14.4. La elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ evocada por histamina en fibroblastos pulmonares es mediada principalmente mediante la activación del H₁R y en menor medida a través del H₂R.

Una vez realizada la curva concentración-respuesta y la determinación de la concentración máxima a la cual los fibroblastos responden a histamina, se procedió a identificar el receptor por medio del cual la histamina ejerce su vía de señalización, para ello, se emplearon antagonistas específicos de los receptores histaminérgicos, para el H₁R se empleó Pirilamina (100 μ M), para el H₂R ranitidina (50 μ M), para el H₃R Clobenpropit (50 μ M) y finalmente para el receptor H₄R el fármaco JNJ7777120 (10 μ M). La manipulación farmacológica de los receptores histaminérgicos reveló que, el bloqueo de los H₁R abolió por completo la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos pulmonares (**Fig. 13A**), el bloqueo de los H₂R disminuyó significativamente la amplitud de la señal de Ca^{2+} (**Fig. 13B**), mientras que el bloqueo de H₃R y H₄R no tuvo una diferencia significativa en la señal de Ca^{2+} respecto a la aplicación de histamina sin la presencia de los agonistas inversos (**Fig. 13C y D**). En la **Fig. 13E**, se resumen los resultados estadísticos de la media \pm EE de la amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina 300 μ M en ausencia (Ctrl) y presencia de los diferentes antihistamínicos. Estos resultados podrían indicar que, para que se lleve a cabo la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$, es necesaria la activación del H₁R principalmente y en menor medida H₂R, mientras que los H₃R y H₄R parecen tener una nula participación en el transiente de Ca^{2+} evocado por histamina en fibroblastos pulmonares de la línea celular WI-38 (**Fig. 13E**).

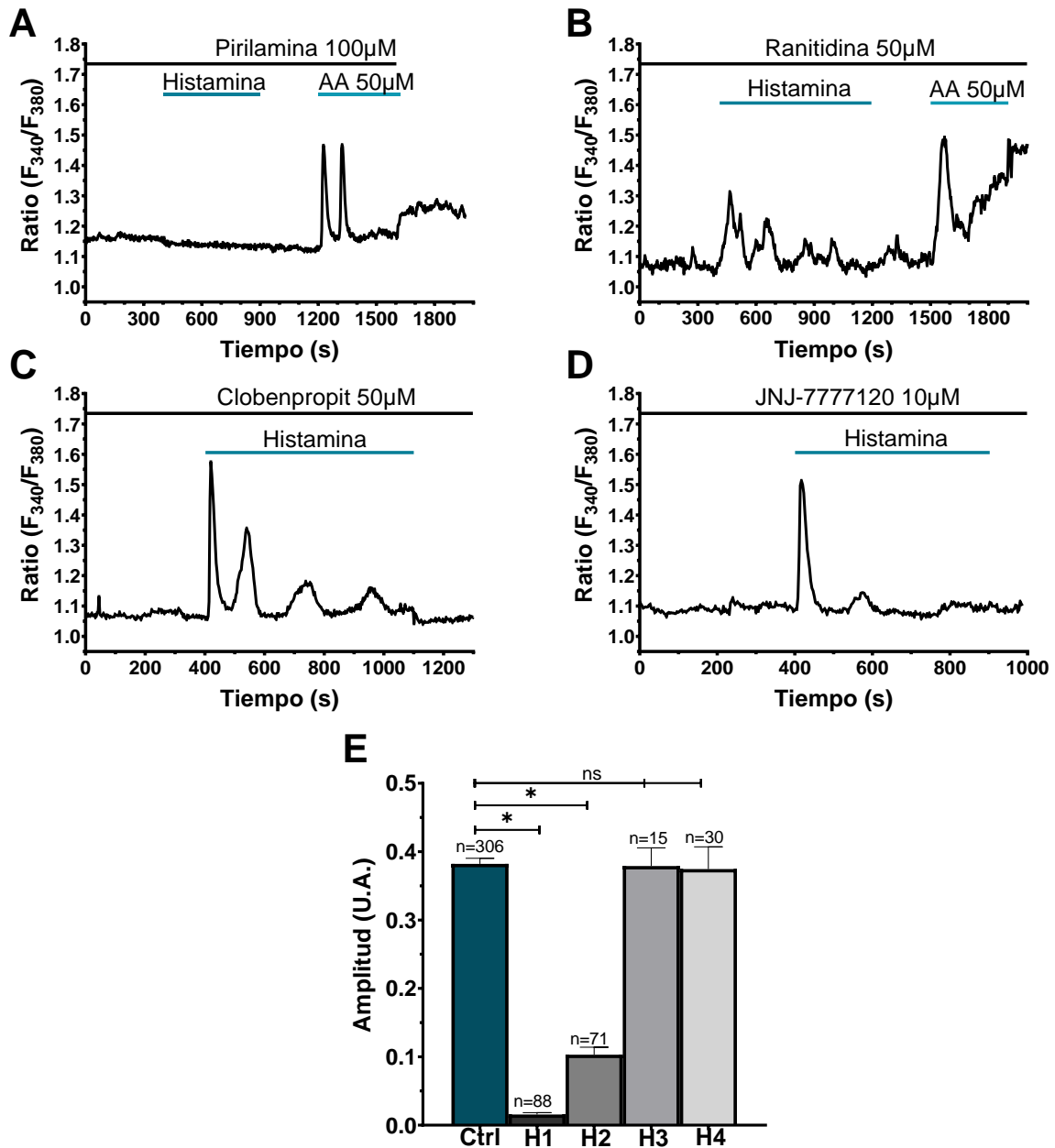


Figura 13. Participación de los receptores histaminérgicos en la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en fibroblastos pulmonares WI-38. **A)** Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en presencia del antihistamínico del H₁R, pirilamina 100 μ M. **B)** Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en presencia del antihistamínico del H₂R, ranitidina 50 μ M. **C)** Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en presencia del antihistamínico del H₃R, clobenpropit 50 μ M. **D)** Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en presencia del antihistamínico del H₄R, JNJ-7777120 10 μ M. Todos los antihistamínicos se preincubaron durante 30 minutos previos a

la aplicación de histamina (no se muestra el tiempo de incubación). Para los experimentos B y C se aplicó Ácido araquidónico (AA 50 μ M) posterior a la aplicación de histamina para corroborar la viabilidad de las células. **D**) Media \pm EE de la amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina 300 μ M en ausencia (Ctrl) y presencia de los antihistamínicos: Pirilamina 100 μ M (H1), Ranitidina 50 μ M (H2), Clobenpropit 50 μ M (H3) y JNJ-7777120 10 μ M (H4). La “n” representa el número de células estudiadas. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba Kruskal-Wallis (* = $p \leq 0.05$), (ns= no significativo).

14.5. La señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos pulmonares WI-38 no implica la activación de la subunidad α_i de la proteína G.

Los resultados mostrados en las **Figuras 13C-13E**, demuestran que los receptores H₃R y H₄R no participan en la señal de Ca^{2+} activada por la histamina. En los capítulos anteriores se describió que los H₃R y H₄R están acoplados canónicamente a proteínas G α_i , por lo tanto, una forma de corroborar la no participación de los H₃R y H₄R en la respuesta de histamina sería demostrar que la inhibición de la subunidad G α_i , tampoco modifica la señal de Ca^{2+} activada por histamina. En efecto, la preincubación (30 min) de los fibroblastos con la toxina pertussis (100 ng/mL), un inhibidor selectivo de la subunidad α_i de la proteína G, confirman que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocado por histamina en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38 es insensible a la inhibición de la subunidad α_i de la proteína G por la toxina pertussis (**Fig. 14A-B**).

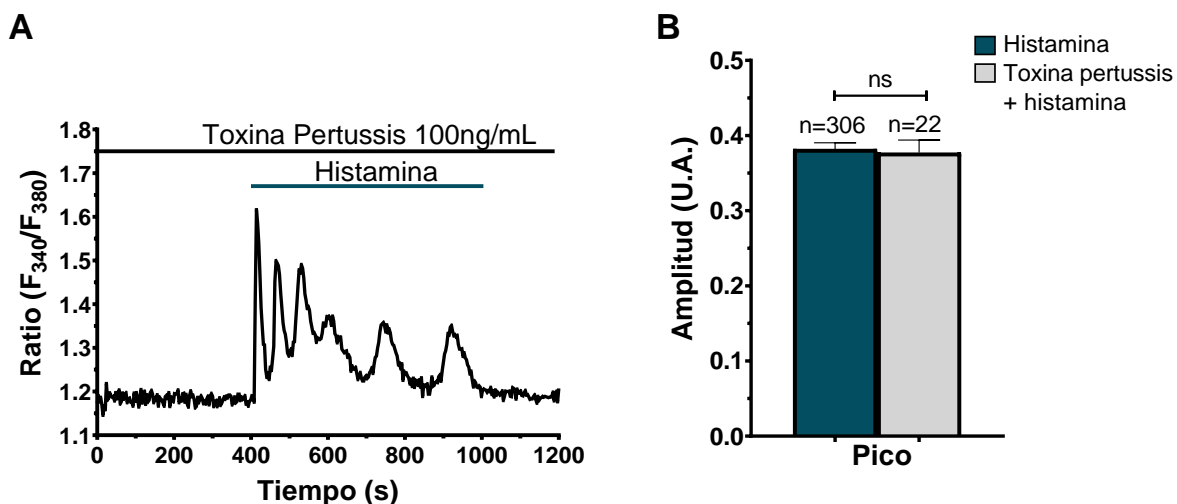


Figura 14. El pretratamiento de fibroblastos pulmonares WI-38 con la toxina pertussis, inhibidor selectivo de la subunidad α_i de la proteína G, no inhibe la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por histamina. A) Registro típico de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina ($300 \mu M$) con la preincubación (30 min-no visible en el registro) de la toxina pertussis (100 ng/mL). **B)** Media \pm EE de la amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina en ausencia (barra azul) y presencia de la toxina pertussis (barra gris). La “n” representa el número de células estudiadas. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba t-Student (ns= no significativo).

14.6. La histamina genera una señal de Ca^{2+} a través de la activación de la PLC y la liberación de Ca^{2+} del RE.

Después de identificar que el H_1R y H_2R son los receptores histaminérgicos implicados en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina, se procedió a diseccionar los fundamentos moleculares del transiente de Ca^{2+} , para ello se emplearon los fármacos: a) U73122 ($10 \mu M$), un inhibidor selectivo de la PLC, b) U73343 ($10 \mu M$), análogo inactivo del U73122 y c) ácido ciclopiazónico (CPA) ($10 \mu M$), un inhibidor selectivo de la SERCA. Los resultados obtenidos demostraron que la inhibición de la PLC con la preincubación de U73122 (15 min) suprime la señal de Ca^{2+} evocada por histamina (**Fig. 15A**), pero no su análogo inactivo (**Fig. 15B**). Así mismo, el vaciamiento del RE por medio de canales de fuga de Ca^{2+} tras la inhibición de la SERCA con CPA en un ambiente libre de Ca^{2+} extracelular previno la señal de Ca^{2+} evocada por histamina (**Fig. 15C**). Estos resultados nos indican que el transiente de Ca^{2+} que se genera tras

la estimulación con histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38 se debe a la activación de la PLC y a la salida de Ca^{2+} del RE (Fig. 15D).

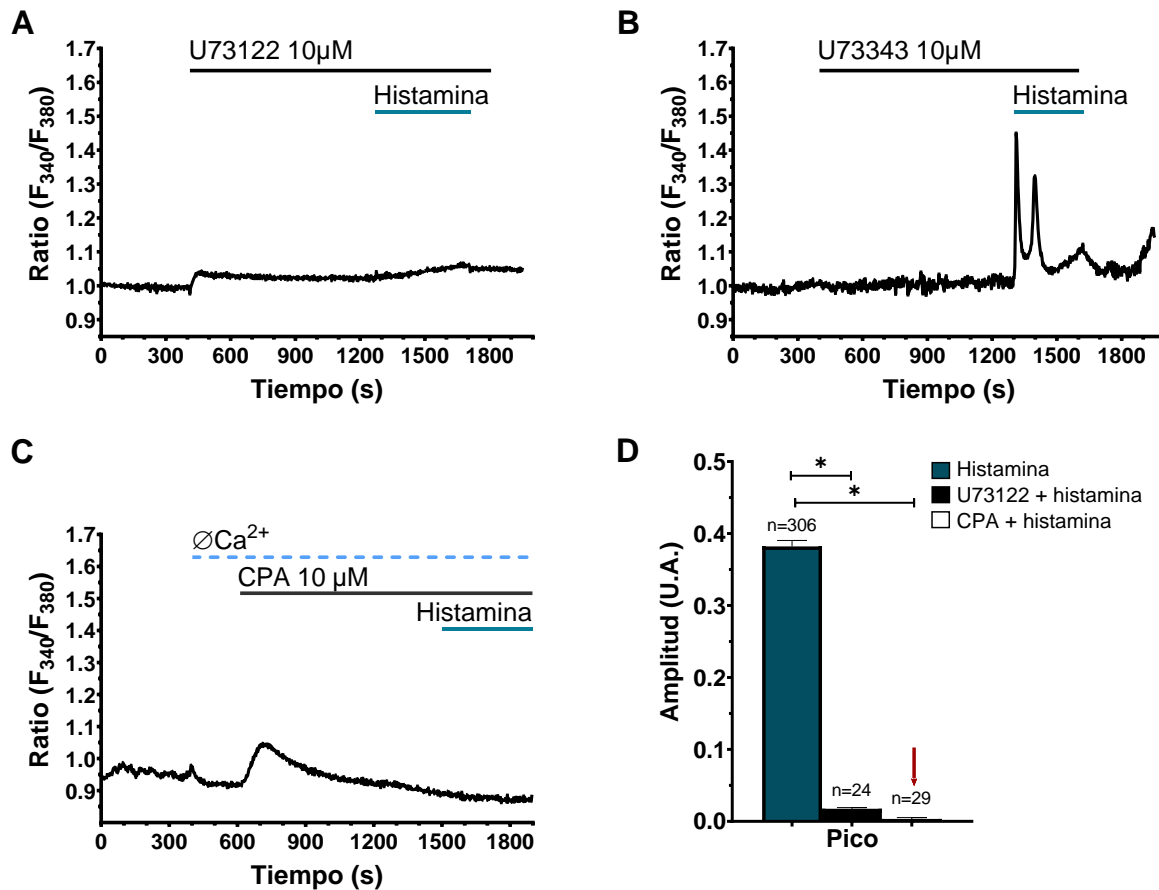


Figura 15. Efecto de la inhibición selectiva de la PLC y el vaciamiento del RE sobre la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38. **A)** Registro típico de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina (300 μ M) inhibida con la preincubación (15 min) del fármaco U73122 (10 μ M), un inhibidor específico de la PLC; **B)** pero no por su análogo inactivo U73343 (10 μ M). El U73122 al momento de ser aplicado presento una elevación variable en la fluorescencia que no afectó el bloqueo ni la medición de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina. **C)** Registro representativo de la señal de Ca^{2+} abolida por el agotamiento de las reservas de Ca^{2+} intracelular con CPA (10 μ M) en ausencia de Ca^{2+} extracelular ($\emptyset \text{Ca}^{2+}$) **D)** Media \pm EE de la amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina 300 μ M (barra azul), amplitud del pico de histamina en presencia del inhibidor de la fosfolipasa C, U73122 10 μ M (barra negra) y amplitud del pico de histamina tras el vaciamiento de las reservas intracelulares de Ca^{2+} (barra blanca no visible, señalada con una fecha roja). La “n” representa el número de células estudiadas. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba ANOVA (* = $p \leq 0.05$).

14.7. Los receptores de IP₃ del RE tienen una participación importante en la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

Al demostrarse que el Ca²⁺ intracelular que participa en la señal de Ca²⁺ evocada por histamina proviene de la reserva intracelular del RE y se produce tras la activación de la PLC, se procedió a evaluar la participación de los IP₃R, ya que se ha reportado que son la vía principal de liberación de Ca²⁺ del RE en fibroblastos. Los resultados obtenidos demuestran que tras la incubación del 2-APB (50 μM-20 min), un fármaco ampliamente utilizado como inhibidor del IP₃R, la amplitud del transiente de Ca²⁺ evocado por histamina se ve reducida significativamente comparada con la amplitud de aplicación de histamina control, tanto en condiciones de concentración de Ca²⁺ extracelular normal (**Fig. 16A y C**), como en ausencia de Ca²⁺ extracelular (**Fig. 16B y C**), en adición a estos resultados, se encontró que el número de oscilaciones disminuyen significativamente al preincubar a los fibroblastos con 2-APB en Ca²⁺ normal (**Fig. 16A y D**) y se eliminan por completo en \emptyset Ca²⁺ (**Fig. 16B y D**). Aunado a esto, la aplicación de 2-APB a los 400 segundos del transiente de histamina, provocó instantáneamente la eliminación de oscilaciones y meseta, este efecto se presentó de manera irreversible (**Fig. 16E**). En conjunto, estos resultados sugieren una fuerte participación por parte de los IP₃R en el transiente de Ca²⁺ evocado por histamina en fibroblastos pulmonares de la línea celular WI-38.

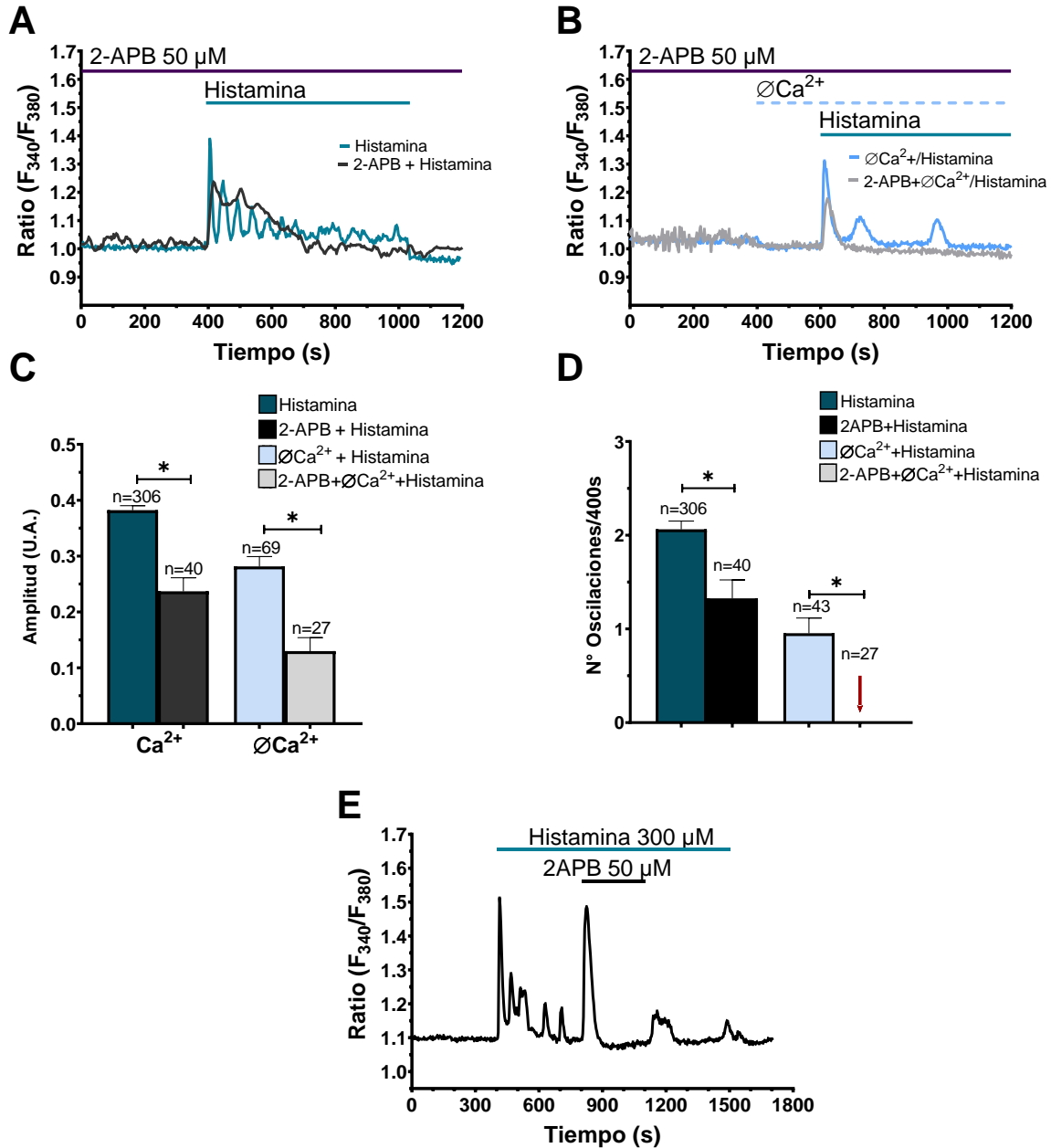


Figura 16. Participación de los receptores de IP₃ en la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38. A) Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por histamina tras la preincubación de 2-APB 50 μ M-20 min (trazado negro) y su control (trazado azul oscuro). **B)** Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en \emptyset Ca²⁺ tras la preincubación de 2-APB 50 μ M-20 min (trazado azul celeste) y su control (trazado gris). En A y B las basales se alinearon para fines comparativos. **C)** Media \pm EE de la amplitud del pico del transiente de Ca²⁺ evocado por histamina 300 μ M (barra azul oscuro), amplitud del pico de histamina en presencia del inhibidor del IP₃R, 2-APB

50 μM (barra negra); amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina 300 μM en $\emptyset\text{Ca}^{2+}$ (barra azul celeste), amplitud del pico de histamina en presencia del inhibidor del IP_3R , 2-APB 50 μM en $\emptyset\text{Ca}^{2+}$ (barra gris). La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba de Mann-Whitney y t-Student respectivamente (* = $p \leq 0.05$). **D)** Media \pm EE del número de oscilaciones presentes en el transiente de Ca^{2+} evocado por histamina 300 μM (barra azul oscuro), número de oscilaciones evocadas por histamina en presencia del inhibidor del IP_3R , 2-APB 50 μM (barra negra); número de oscilaciones evocadas por histamina en $\emptyset\text{Ca}^{2+}$ (barra azul celeste), número de oscilaciones evocadas por histamina en presencia del inhibidor del IP_3R , 2-APB 50 μM en $\emptyset\text{Ca}^{2+}$ (barra gris no visible, señalada con una fecha roja). La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba de Mann-Whitney (* = $p \leq 0.05$). **E)** Registro típico de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina y el efecto de la aplicación de 2-APB a los 400 segundos.

14.8. La entrada de Ca^{2+} extracelular contribuye en la señal intracelular de Ca^{2+} inducida por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

Dentro de este marco, se procedió a evaluar la contribución del Ca^{2+} extracelular, exponiendo a los fibroblastos a histamina en ausencia de Ca^{2+} externo para evitar la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. La histamina provocó un aumento inmediato de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} extracelular en 66 de 69 células (**Fig. 17A**), sin embargo, se encontraron reducciones significativas en la basal (**Fig. 17B**), amplitud del pico, meseta (**Fig. 17C**) y número de oscilaciones (**Fig. 17D**) en comparación con el transiente de Ca^{2+} evocado por histamina en presencia de Ca^{2+} extracelular. Estos resultados indican que la amplitud del pico, la amplitud de la meseta y el número de oscilaciones en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina se debe tanto a la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares como al influjo de Ca^{2+} del medio extracelular. De un total de 1766 células 1114 presentaron una actividad basal espontánea (63.08%), en los experimentos donde se retiró el Ca^{2+} extracelular esta actividad espontánea cesó.

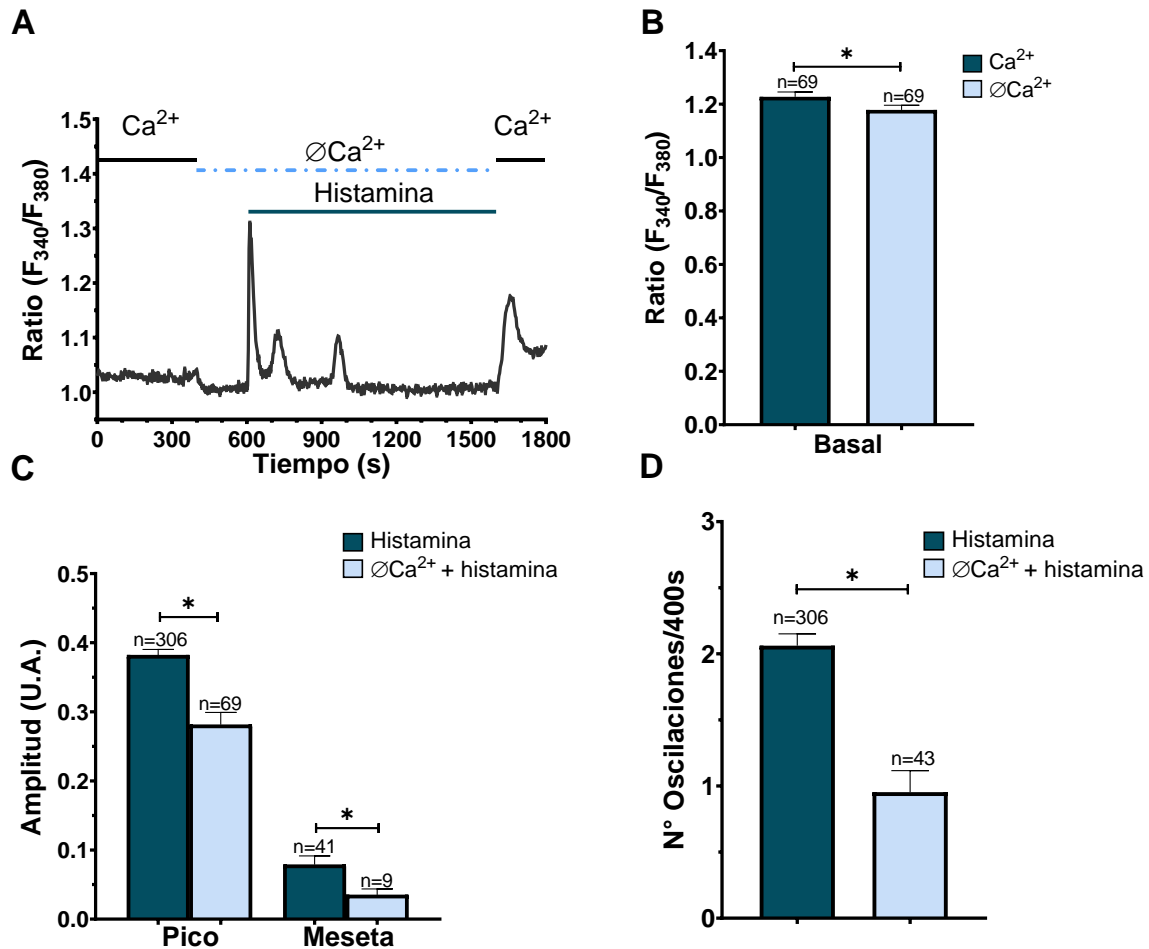


Figura 17. Efecto de la remoción del Ca²⁺ extracelular sobre la señal de Ca²⁺ evocada por Histamina en fibroblastos WI-38. **A)** Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por histamina en ausencia de Ca²⁺ extracelular. **B)** Media \pm EE de la [Ca²⁺]_i basal en fibroblastos al no ser estimulados por un agonista en presencia (barra azul oscuro) y ausencia (barra azul celeste) de Ca²⁺ extracelular. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba t-Student (* = p \leq 0.05). **C)** Media \pm EE de la amplitud del pico y meseta en presencia (barra azul oscuro) y ausencia (barra azul celeste) de Ca²⁺ extracelular. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba t-Student para el pico y Mann-Whitney para la meseta (* = p \leq 0.05). **D)** Media \pm EE del número de oscilaciones presentadas en los primeros 400 segundos para cada una de las aplicaciones en presencia (barra azul oscuro) y ausencia (barra azul celeste) de Ca²⁺ extracelular. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba Mann-Whitney (* = p \leq 0.05).

14.9. La entrada de Ca^{2+} a través de los SOC juega un papel importante en la meseta y oscilaciones del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina en fibroblastos pulmonares WI-38.

Los resultados hasta ahora mencionados denotan una importante participación por parte del Ca^{2+} extracelular tanto en la amplitud del pico y meseta como en el número de oscilaciones del transiente de Ca^{2+} al estimular a los fibroblastos con histamina, debido a esto se procedió a analizar el papel que tiene la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los SOC. Para ello se emplearon los inhibidores inespecíficos de los SOC, La^{3+} (10 μM) y Gd^{3+} (10 μM). Los resultados mostraron que la aplicación tanto de La^{3+} como Gd^{3+} a los 400 segundos del transiente de histamina, eliminó inmediatamente la presencia de oscilaciones y meseta, este efecto se presentó de manera reversible (**Fig. 18 A-D**). En resumen, estos resultados sugieren una fuerte participación por parte de la entrada de Ca^{2+} a través de los SOC en el transiente de Ca^{2+} evocado por histamina en fibroblastos pulmonares de la línea celular WI-38.

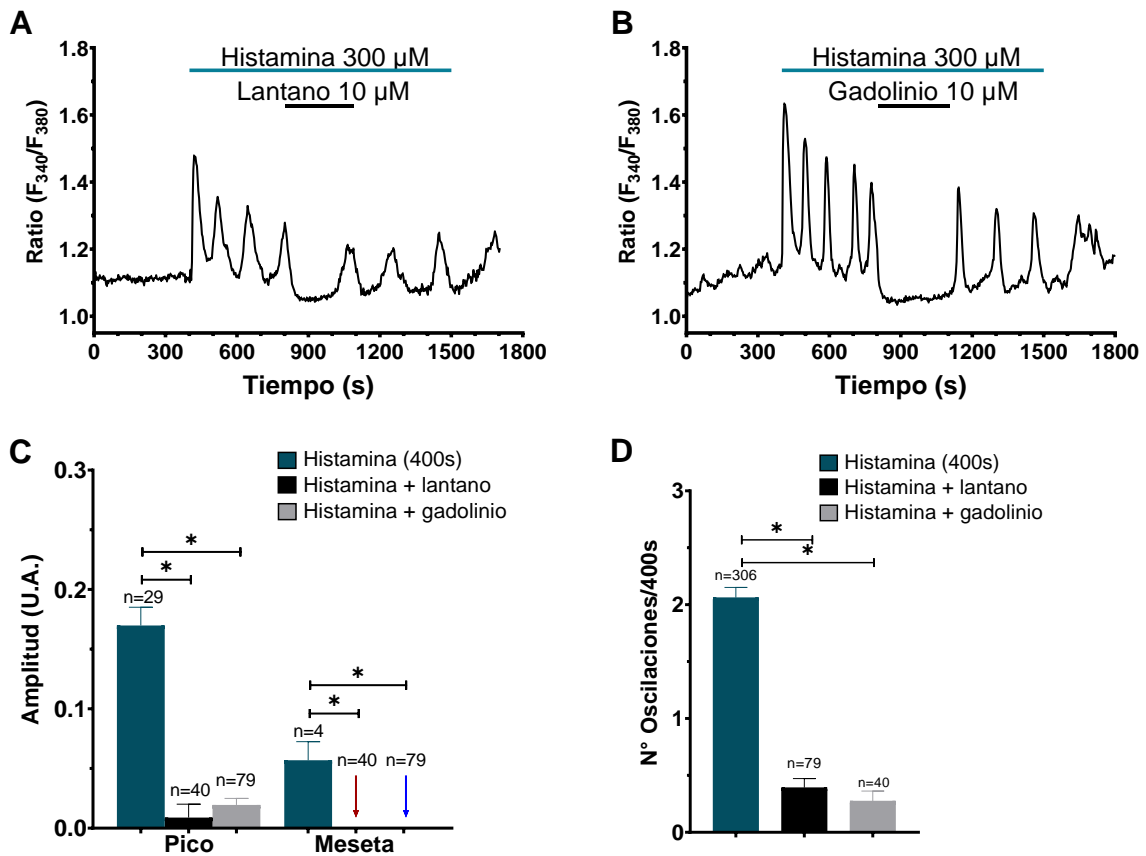


Figura 18. Efecto del bloqueo de la SOCE en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos pulmonares. A) Registro típico de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina y la aplicación de La^{3+} a los 400 segundos. **B)** Registro típico de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina y la aplicación de Gd^{3+} a los 400 segundos. **C)** Media \pm EE de la amplitud del pico y meseta del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina 300 μM (barras azul oscuro), amplitud del pico y meseta inducido por histamina tras la aplicación de La^{3+} (barras negras); amplitud del pico y meseta inducido por histamina tras la aplicación de Gd^{3+} (barras grises). **D)** Media \pm EE del número de oscilaciones presentadas en 400 segundos posterior a la aplicación de los inhibidores de la SOCE. Únicamente histamina (barra azul oscuro), Gd^{3+} (Barra negra) y La^{3+} (Barra gris). La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba Kruskal-Wallis (* = $p \leq 0.05$).

14.10. El bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a través de los VOC no afecta la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por histamina.

Existe evidencia del papel clave que desempeñan los VOC en la señal de Ca^{2+} inducida por TGF- β en fibroblastos pulmonares humanos. Es por ello por lo que se procedió a evaluar su participación en la señal de Ca^{2+} intracelular inducida por histamina. Para el análisis se empleó un antagonista inespecífico (níquel 10 μM) y un antagonista específico (nifedipina 10 μM), los resultados muestran que no existen diferencias significativas en la amplitud del pico y meseta (**Fig. 19A-20A**), así como en el número de oscilaciones (**Fig. 19B-20B**), del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina al inhibir la entrada de Ca^{2+} a través de los VOC (**Fig. 19C-20C**).

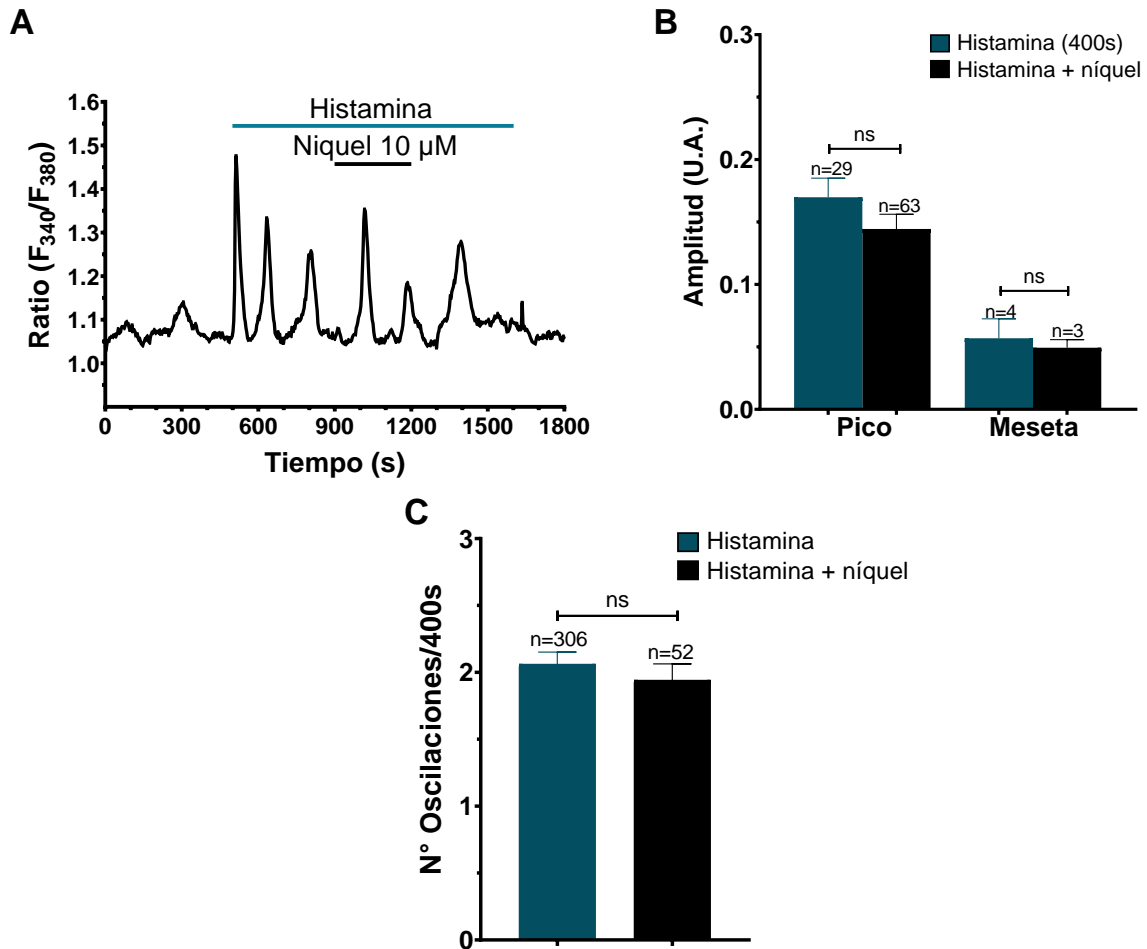


Figura 19. Efecto del bloqueo inespecífico de los VOC por níquel en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38. A) Registro típico de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en presencia de Níquel (10 μ M). La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba de Mann-Whitney (ns = no significativo). **B)** Media \pm EE de la amplitud del pico y meseta del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina 300 μ M (barra azul oscuro), amplitud del pico de histamina en presencia del inhibidor inespecífico de los VOC, Níquel 10 μ M (barra negra). **C)** Media \pm EE del número de oscilaciones presentes a los 400 segundos del transiente de Ca^{2+} posterior a la aplicación de histamina 300 μ M (barra azul oscuro), número de oscilaciones evocadas por histamina en presencia del inhibidor inespecífico de los VOC, Níquel 10 μ M (barra negra).

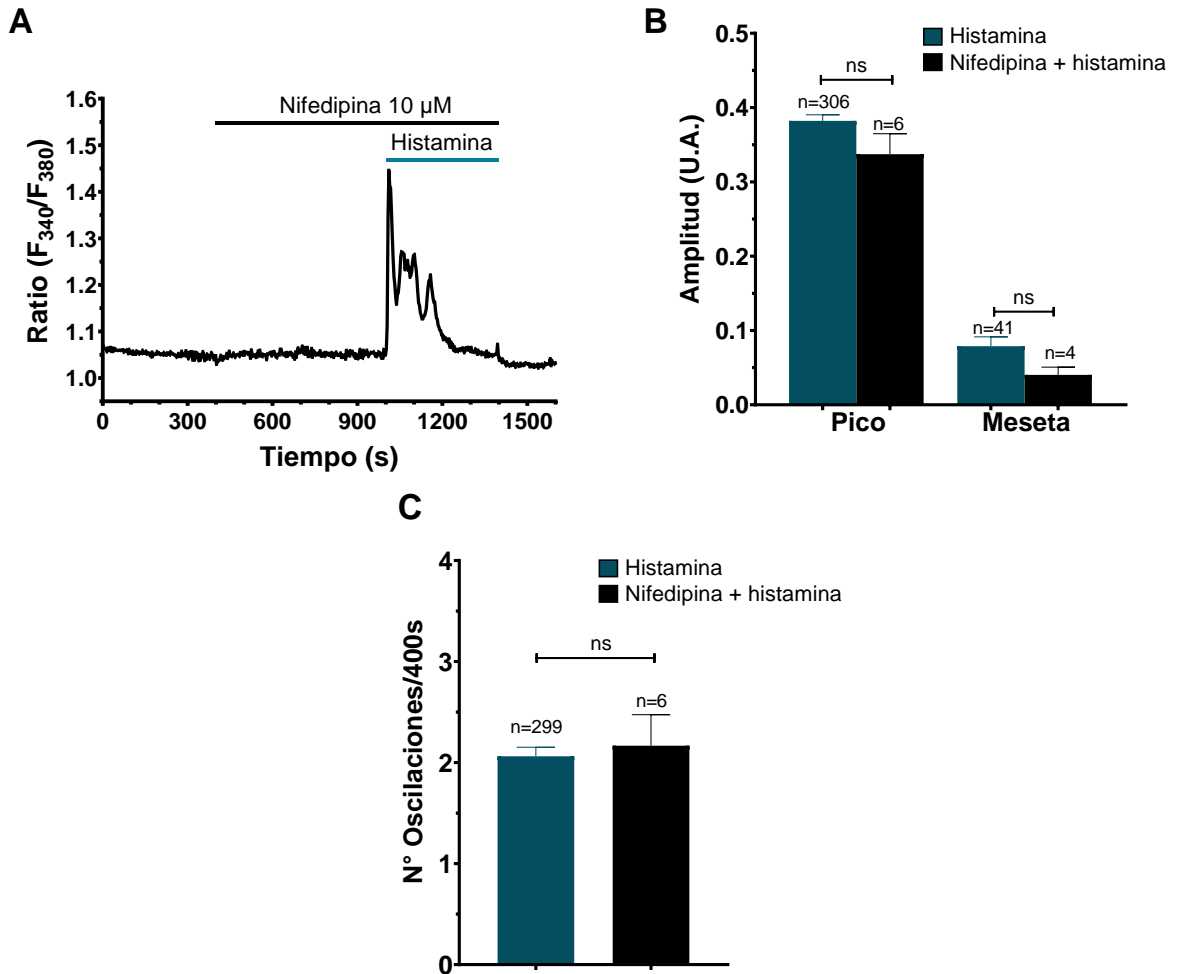


Figura 20. Efecto del bloqueo específico de los VOC por nifedipina en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano WI-38. A) Registro típico de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en presencia de Nifedipina (10 μ M). La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba de Mann-Whitney (ns = no significativo). La Nifedipina, en algunos casos, al momento de ser aplicada presentó una elevación variable en la fluorescencia que no afectó el bloqueo ni la medición de la señal de Ca^{2+} evocada por histamina. **B)** Media \pm EE de la amplitud del pico y meseta del transiente de Ca^{2+} evocado por histamina 300 μ M (barra azul oscuro), amplitud del pico de histamina en presencia del inhibidor específico de los VOC, Nifedipina 10 μ M (barra negra). **C)** Media \pm EE del número de oscilaciones presentes a los 400 segundos del transiente de Ca^{2+} posterior a la aplicación de histamina 300 μ M (barra azul oscuro), número de oscilaciones evocadas por histamina en presencia del inhibidor específico de los VOC, Nifedipina 10 μ M (barra negra).

15. Discusión

La remodelación pulmonar es la principal complicación a largo plazo del asma, esta se presenta cuando existe un estado inflamatorio persistente en el epitelio de las vías respiratorias, en respuesta a este estímulo nocivo, en un intento de adaptación se producen cambios en la arquitectura pulmonar, como resultado de este proceso de “cicatrización” se produce una restricción en el flujo del aire de manera irreversible. Se ha descrito la presencia de altas concentraciones de mastocitos e histamina en la remodelación pulmonar y al fibroblasto como un elemento clave para el desarrollo de esta complicación, sin embargo, hasta ahora no se han empleado dianas terapéuticas ni se tiene un panorama claro del efecto de la histamina en la señalización de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares. El papel que juega el Ca^{2+} libre intracelular como segundo mensajero, ha sido ampliamente estudiado en diferentes tipos de células. La elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurre a través de distintas vías de señalización y regula una gran cantidad de funciones celulares, en las células no excitables (como los fibroblastos), regula la transcripción de genes, migración, proliferación, expresión de proteínas, por mencionar algunos ejemplos. En este contexto, nuestros resultados proveen la primera caracterización detallada del efecto que genera la histamina en la señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares normales de la línea celular WI-38.

En el campo de la señalización de Ca^{2+} existe una pregunta clave ¿De qué manera un simple ion puede regular un espectro tan amplio de procesos celulares? La respuesta radica en la enorme diversidad espacial y temporal de la señal, ya que una respuesta de Ca^{2+} puede exhibir patrones infinitos (83). La introducción de la microfluorimetría y las técnicas de análisis de imagen han permitido a los investigadores monitorear los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células individuales simultáneamente, el uso de estas técnicas ha revelado un sorprendente grado de heterogeneidad de respuestas en poblaciones de células. En nuestros resultados la histamina evocó una serie de patrones complejos en la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que mostró al menos 4 tipos de respuesta tras la estimulación del agonista, los patrones encontrados fueron 1) Un aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que rápidamente decayó a la línea basal, denominado pico, 2) Una señal bifásica que comprendía un aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seguido de aumentos periódicos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, denominado pico

y oscilaciones, 3) Una señal que comprendía un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ seguido de un aumento sostenido de amplitud intermedia aunada a aumentos periódicos en la $[Ca^{2+}]_i$, denominado pico meseta y oscilaciones, y 4) un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ seguido únicamente de un aumento sostenido de amplitud variable en la $[Ca^{2+}]_i$, denominado pico y meseta. La heterogeneidad de la señal de Ca^{2+} en una misma población de células se ha discutido ampliamente, la asincronía del ciclo celular es una explicación poco probable debido a que nuestros experimentos se realizaron en fibroblastos desprovistos de suero durante 48 horas, lo que produce un detenimiento en la fase del ciclo celular a la fase G_0 (84), de la misma manera, estudios en fibroblastos y otros tipos de células han reportado que esta variabilidad no se debe a la asincronía del ciclo celular (82,85,86). Por otra parte, se han propuesto como responsables de la heterogeneidad en la señal de Ca^{2+} a factores intrínsecos de cada célula como variaciones en los patrones de expresión o distribución subcelular de los componentes que participan en la señalización de Ca^{2+} , como lo son las diversas isoformas de los IP_3Rs (82,87–89) o componentes de la entrada de Ca^{2+} operada por almacenamiento como STIM y ORAI (88). También se ha reportado que la frecuencia de oscilaciones presentes en la señal de Ca^{2+} depende de la concentración del agonista (90), así mismo, nosotros encontramos que el número de oscilaciones y los patrones en la dinámica del Ca^{2+} dependen de la concentración de histamina, ya que a menor concentración predomina el patrón de pico y a mayor concentración predomina el patrón de pico, meseta y oscilaciones. Existen otros factores mutuamente no excluyentes que podrían explicar la heterogeneidad en la respuesta de Ca^{2+} a histamina como lo son la concentración basal de Ca^{2+} intracelular, y la relación de cada célula con otras células debido a su interacción a través de uniones comunicantes, es importante tener en cuenta estos factores para futuras investigaciones, así como también, se requerirán más estudios para establecer la función fisiológica de la heterogeneidad de las respuestas de Ca^{2+} en una misma población de células.

La realización de la curva concentración-respuesta no acumulativa inducida por histamina permitió determinar la EC_{50} (5.49 μM), la concentración máxima (300 μM) y la concentración umbral (100 nM) de la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. En 2014 Horie y

colaboradores, demostraron que la histamina ejerce una contracción de gel de colágeno en fibroblastos pulmonares a una concentración de 100 nM a 100 μ M (9), del mismo modo estudios preliminares en nuestro laboratorio conducidos por Romano-Bernabé y colaboradores demostraron que el efecto máximo que ejerce la histamina sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares extraídos de donantes cadavéricos se da a una concentración de 100 μ M, sin embargo, nuestros resultados demostraron que el efecto máximo que ejerce la histamina en fibroblastos pulmonares de la línea celular WI-38 se produce a una concentración de 300 μ M, además, es a esta concentración en la que se producen los 4 tipos de patrones en la dinámica de Ca^{2+} , es por ello que decidimos continuar los siguientes experimentos a una concentración de 300 μ M.

La aplicación consecutiva de histamina a la misma concentración (300 μ M) después de realizar un lavado con PSS en un mismo fibroblasto, provocó una disminución en la respuesta, este fenómeno es conocido como desensibilización homóloga. La desensibilización se considera uno de los principales mecanismos de regulación de los GPCR; este proceso se caracteriza por una pérdida de la capacidad de respuesta del receptor, a pesar de la presencia continua de una alta concentración de un estímulo. Se ha informado que la desensibilización homóloga de los receptores histaminérgicos ocurre en preparaciones de músculo liso (91,92), células HeLa (93), y varios sistemas de células aisladas, incluidos los fibroblastos (8,94).

La histamina ejerce su actividad a través de 4 receptores acoplados a proteínas G, los GPCR pueden verse como "interruptores celulares" que se encuentran en un equilibrio entre el estado inactivo o "apagado" y el estado activo o "encendido", los antihistamínicos que no están relacionados estructuralmente con la histamina no antagonizan la unión de la histamina, en cambio, actúan como agonistas inversos, en este sentido producen el efecto opuesto de la histamina sobre el receptor, en consecuencia, el término preferido para definir a estos fármacos es "antihistamínicos" en lugar de "antagonistas de la histamina" (95). En este trabajo utilizamos antihistamínicos específicos para los 4 diferentes tipos de receptores a histamina, los resultados mostraron que la histamina genera un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ principalmente a través del H₁R y en menor medida a través del H₂R, por otro lado los H₃R y H₄R

parecen no jugar un papel fundamental, estos resultados se vieron apoyados debido a que el transiente de Ca^{2+} evocado por histamina no se vio alterado a pesar de la ribosilación de la subunidad α_i de la proteína G por la toxina pertussis, tanto el H_3R como el H_4R se encuentran acoplados a una proteína $\text{G}\alpha_i$, mientras que los H_1R se encuentran acoplados a una proteína $\text{G}\alpha_q$ y los H_2R a una proteína $\text{G}\alpha_s$. Nuestros resultados son consistentes con los reportados por Romano-Bernabé et al., 2012 y Veerappan et al., 2013 en fibroblastos de pulmón humano (8,96). En contraste con nuestros resultados, Horie y colaboradores reportaron la participación únicamente del H_1R en la contracción de gel de colágeno inducida por histamina en fibroblastos pulmonares, pero no ahondaron en la posible participación del H_2R a pesar de observar una pequeña respuesta en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en presencia de difenhidramina, un antihistamínico del H_1R (9).

Por otra parte, Jordana y colaboradores en 1988 reportaron que la proliferación inducida por histamina en fibroblastos de pulmón humano normal se da únicamente a través de los H_2R (73). Estas discordancias en los resultados pueden deberse a la diafonía que existe entre los H_1R y H_2R , la diafonía biológica se refiere a situaciones en las que uno o más componentes de una vía de transducción de señales afectan a la otra. Experimentos realizados por Alonso y colaboradores en 2013 demostraron que los H_1R y H_2R se desensibilizan mutuamente y se internalizan de forma cruzada formando heterodímeros en células U937 y células transfectadas de ovario de hámster chino (97). Se puede especular que en tejidos donde coexisten ambos receptores, el mecanismo regulador descrito anteriormente podría tener profundas consecuencias sobre la respuesta a histamina. Otra posible explicación es la falta de conocimiento que existe sobre los mecanismos por los cuales los antihistamínicos bloquean la señalización de los receptores histaminérgicos. Varios estudios han sugerido que la interacción de la proteína G con el receptor es más complicado de lo que se había previsto anteriormente (98). Es importante considerar la expresión y función de los H_1R y H_2R en el efecto que causa la histamina en fibroblastos de pulmón humano para futuras investigaciones ya que en la actualidad los antihistamínicos de los H_1Rs se emplean únicamente para enfermedades alérgicas como el prurito y la rinitis alérgica, y en el caso de los antihistamínicos de los H_2Rs se emplean para enfermedades

relacionadas con la secreción del ácido gástrico, mientras que para el tratamiento del asma únicamente se han empleado antihistamínicos de los H₄R como reguladores de la respuesta inmune. Estas futuras investigaciones podrían abrir paso a usos terapéuticos no tradicionales de los H₁R y H₂R en la prevención de complicaciones irreversibles del asma como la remodelación pulmonar, donde hasta ahora no existe un tratamiento o prevención eficaz.

Los mecanismos que controlan la movilización del Ca²⁺ citosólico son clave para la regulación de numerosas funciones de las células eucariotas (47), es por ello que después de identificar a los receptores histaminérgicos responsables de la señal de Ca²⁺ evocada por histamina nos dispusimos a diseccionar los fundamentos moleculares del transiente de Ca²⁺. Los resultados que presentamos en este trabajo mostraron que la inhibición de la actividad de la PCL, así como la depleción de los almacenes intracelulares de Ca²⁺ previnieron el transiente de Ca²⁺ evocado por histamina. La liberación de Ca²⁺ de las reservas intracelulares está mediada por una variedad de mensajeros y canales intracelulares, una de las vías ampliamente expresadas en las células es la vía de señalización PLC/IP₃. La unión del agonista a los GPCR resulta en la activación de la PLC a través de las subunidades Gαq o Gβγ, esto conduce a la generación de IP₃ que llega al RE, provocando la apertura de los canales de Ca²⁺ sensibles a IP₃ y a la liberación del Ca²⁺ almacenado en el RE hacia el citosol (99). Para evaluar la participación de los almacenes intracelulares empleamos el 2-ABP, un fármaco ampliamente utilizado para probar la contribución del IP₃R en la generación de la señal de Ca²⁺ intracelular. Nuestros resultados demostraron que existe una fuerte participación por parte de los IP₃Rs en el transiente de Ca²⁺ evocado por histamina en fibroblastos pulmonares WI-38, pues al inhibir al IP₃R la amplitud del transiente de Ca²⁺ se vio reducida significativamente comparada con la amplitud de la aplicación de histamina control, esto sucedió tanto en condiciones de concentración de Ca²⁺ extracelular normal, como en ausencia de Ca²⁺ extracelular, además, el número de oscilaciones disminuyó significativamente en Ca²⁺ normal y se eliminaron por completo en ∅Ca²⁺. Algo que debemos recalcar en los resultados anteriormente planteados, es que la inhibición de los IP₃Rs por el fármaco 2-APB a pesar de disminuir la amplitud del transiente no eliminó por completo la señal de Ca²⁺

inducida por histamina como era de esperarse y como se ha reportado en otros estudios en fibroblastos (8,9) en otros tipos de células (90), o con la aplicación de agonistas diferentes a la histamina (82). Este fenómeno puede ser explicado por varias razones, en principio la capacidad del 2-APB de penetrar en diferentes tipos de células parece variar significativamente, esto podría explicar la alta sensibilidad en algunos tipos de células y la falta de efecto en otros (100). Una segunda explicación es que el grado de inhibición del 2-APB depende de la concentración de histamina, un trabajo realizado en células HeLa por Peppiat y colaboradores demostró que el 2-APB fue capaz de inhibir completamente la respuesta de Ca^{2+} evocada por ATP a concentraciones máximas, en contraste con las respuestas evocadas por histamina donde el 2-APB redujo con mayor eficacia la respuesta de histamina a concentraciones menores, mientras que a concentraciones submáximas de histamina aún podía verse una señal de Ca^{2+} (101). Es probable que se requiera una concentración mayor de 2-APB para bloquear a los IP_3Rs en nuestros experimentos, el problema radica en que a pesar de ser el fármaco más eficaz para la inhibición de los IP_3Rs , el 2-APB posee efectos adicionales de acuerdo a su concentración, es decir, un aumento de la concentración podría influir en la modulación de la SOCE y una disminución de la concentración podría influir en la actividad de la SERCA (102). En futuras investigaciones para conocer los efectos de la inhibición del IP_3R es necesario utilizar al menos dos inhibidores diferentes, por ejemplo, xestospongina y 2-APB tal y como nos aconsejan Gambarella y colaboradores en su reciente revisión sobre los moduladores de los IP_3Rs (102). Se hace necesario resaltar que, aunque se ha reportado que los almacenes intracelulares mediados por RyR no tienen una importancia preponderante en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos, habrá que descartar su posible participación en próximas investigaciones.

Si bien es cierto que los almacenes intracelulares tienen una gran participación en la señal de Ca^{2+} inducida por histamina, el Ca^{2+} extracelular también juega un papel fundamental, estas afirmaciones son apoyadas por nuestros resultados, debido a que la aplicación de histamina en un medio ausente de Ca^{2+} extracelular produjo una serie de hallazgos interesantes, entre los que detallamos: la disminución de la concentración basal de Ca^{2+} citoplasmático y la disminución de la amplitud del pico, de la amplitud

de la meseta y el número de oscilaciones. Así mismo, observamos que la actividad espontánea (presente en un 63.08% de un total de 1766 fibroblastos) cesó al retirarse el Ca^{2+} extracelular, estos hallazgos sugieren que la actividad espontánea en fibroblastos pulmonares desprovistos de suero se debe a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular, algo similar fue reportado en un trabajo publicado por Jing-Bo Chen y colaboradores donde describen que la presencia de oscilaciones espontáneas en fibroblastos cardíacos humanos desprovistos de suero, se debe a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de la SOCE (50). Dados estos resultados, es necesario explorar las posibles vías de entrada para determinar el mecanismo específico que produce la actividad espontánea en fibroblastos de pulmón humano.

Como se mencionó en párrafos anteriores existen varias vías de entrada de Ca^{2+} del medio extracelular, la vía principal es a través de la SOCE, la cual se produce por la depleción de los almacenes de Ca^{2+} intracelulares, para evaluar esta vía utilizamos La^{3+} y Gd^{3+} , la aplicación de ambos antagonistas de los SOC a los 400 segundos después de la aplicación de histamina abolió por completo la presencia de oscilaciones y meseta en el transiente de Ca^{2+} evocado por histamina en fibroblastos pulmonares.

Otro mecanismo de entrada de Ca^{2+} un poco menos convencional en células no excitables, pero que se ha reportado como la vía de entrada de Ca^{2+} responsable de las oscilaciones en fibroblastos pulmonares evocadas por factores de crecimiento, son los VOC (103), para evaluarlos usamos un inhibidor específico y uno inespecífico, en ambos casos los resultados mostraron que los VOC no juegan un papel importante en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38, estos nuevos resultados coinciden con los encontrados previamente en nuestro laboratorio en fibroblastos pulmonares extraídos de donantes cadavéricos (8).

Es importante enfatizar la importancia de estudiar los mecanismos que producen las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por histamina en fibroblastos pulmonares. Las células utilizan varios métodos para manipular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con el fin de obtener una respuesta específica, el método más eficaz utilizado por las células es la generación de oscilaciones de Ca^{2+} , estas oscilaciones pueden ocurrir en respuesta a la

estimulación de una gran variedad de hormonas y agonistas, o pueden ocurrir de manera espontánea, las oscilaciones permiten que el Ca^{2+} pueda ser desplegado sin acumularse en niveles tóxicos, algunos investigadores han propuesto que las oscilaciones no solo son una forma de protección contra la toxicidad del Ca^{2+} sino una forma de procesamiento de información que involucra la modulación de la frecuencia así como la amplitud de respuesta (104).

Los resultados obtenidos confirman nuestra hipótesis que la histamina genera una señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares a través de la activación de receptores histaminérgicos, la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares y la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. Aún falta mucho por investigar y cada vez que se descubre algo surgen nuevas interrogantes, el trabajo aquí presentado aporta información valiosa para la comprensión de los mecanismos que regulan la señal de Ca^{2+} evocada por histamina en fibroblastos pulmonares. Una limitación del presente estudio es que no utilizamos fibroblastos pulmonares de un modelo asmático o de pacientes con asma, resulta pertinente hacer la comparación del efecto que genera la histamina en fibroblastos pulmonares de vías respiratorias normales y en fibroblastos pulmonares de vías respiratorias con asma.

16. Conclusiones

- I. La aplicación de histamina induce una respuesta heterogénea en la señal de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares WI-38 y estos patrones fueron dependientes de la concentración de histamina.
- II. La histamina genera una señal de Ca^{2+} de manera concentración-dependiente con una EC_{50} de 5.49 μM .
- III. La aplicación consecutiva de histamina en un mismo fibroblasto produce desensibilización homóloga en el receptor.
- IV. La señal de Ca^{2+} inducida por histamina se produce a través del H_1R principalmente y en menor medida a través del H_2R .
- V. La señal de Ca^{2+} evocada por histamina es insensible a la inhibición de la subunidad α_i de la proteína G de los GPCRs.

- VI. La histamina ejerce su efecto en la señal de Ca^{2+} a través de la activación de la PLC y del vaciamiento del RE.
- VII. Los almacenes de Ca^{2+} sensibles a IP_3 participan en la señal de Ca^{2+} inducida por histamina en fibroblastos pulmonares.
- VIII. El Ca^{2+} extracelular contribuye tanto en la señal de Ca^{2+} evocada por histamina como en la actividad espontánea de los fibroblastos pulmonares.
- IX. La entrada de Ca^{2+} a través de los SOC contribuye a las oscilaciones evocadas por histamina.
- X. La entrada de Ca^{2+} a través de los VOC no contribuye al transiente de Ca^{2+} evocado por histamina.

17. Bibliografía.

1. Dharmage SC, Perret JL, Custovic A. Epidemiology of asthma in children and adults. *Front Pediatr*. 2019;7(JUN):1–15.
2. Holguin F, Cardet JC, Chung KF, Diver S, Ferreira DS, Fitzpatrick A, et al. Management of severe asthma: A European Respiratory Society/American Thoracic Society guideline. *Eur Respir J [Internet]*. 2020;55(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.00588-2019>
3. Hough KP, Curtiss ML, Blain TJ, Liu RM, Trevor J, Deshane JS, et al. Airway Remodeling in Asthma. *Front Med*. 2020;7(May).
4. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1360–8.
5. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*. 2002;346(22):1699–705.
6. Yamauchi K. [Regulation of gene expression of L-histidine decarboxylase and histamine N-methyl-transferase, and its relevance to the pathogenesis of bronchial asthma]. *Nihon Rinsho [Internet]*. 1996;54(2):377—388. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/8838085>
7. Yamauchi K, Ogasawara M. The role of histamine in the pathophysiology of asthma and the clinical efficacy of antihistamines in asthma therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7).
8. Romano Bernabe, F., Vazquez de Lara, L., Lopez Colombo, A., Berra Romani R. Caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la señal de calcio intracelular evocada por histamina en fibroblastos de pulmón humano. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2012.
9. Horie M, Saito A, Yamauchi Y, Mikami Y, Sakamoto M, Jo T, et al. Histamine induces human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction via histamine H1 receptor. *Exp Lung Res*. 2014;40(5):222–36.
10. Netuveli G, Hurwitz B, Sheikh A. Lineages of language and the diagnosis of asthma. *J R Soc Med*. 2007;100(1):19–24.
11. Saunders KB. Origin of the word “asthma.” *Thorax [Internet]*. 1993 Jun;48(6):647. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC464596/>
12. Salter HH. On asthma: its pathology and treatment [Internet]. Philadelphia : Blanchard and Lea 1864, editor. Vols. viii, [17]. 1864 [cited 2021 Jun 2]. 260 p. Available from: <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-65350690R-bk>
13. Sakula A. Henry Hyde Salter (1823-71): a biographical sketch. *Thorax*

- [Internet]. 1985 Dec 1;40(12):887–8. Available from:
<https://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thx.40.12.887>
14. Holgate ST. A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis. *Allergy, Asthma Immunol Res.* 2010;2(3):165–71.
 15. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA). 2021.
 16. Organización Mundial de la Salud. Asma [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 2]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
 17. OMS | Repercusión del asma en la salud pública. WHO [Internet]. 2013 [cited 2021 May 26]; Available from: <https://www.who.int/bulletin/volumes/83/7/bousquetabstract0705/es/#.YK2RQw wMV1Y.mendeley>
 18. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet.* 2020;396(10258):1204–22.
 19. Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. *Lancet.* 2018;391(10122):783–800.
 20. García-Sancho C, Fernández-Plata R, Martínez-Briseño D, Franco-Marina F, Pérez-Padilla JR. Prevalencia y riesgos asociados con pacientes adultos con asma de 40 años o más de la Ciudad de México: estudio de base poblacional. *Salud Publica Mex.* 2012;54(4):425–32.
 21. Del-Rio-Navarro B, Del Rio-Chivardi JM, Berber A, Sienra-Monge JJJ, Rosas-Vargas MA, Baeza-Bacab M. Asthma prevalence in children living in north Mexico City and a comparison with other Latin American cities and world regions. *Allergy Asthma Proc.* 2006;27(4):334–40.
 22. Del-Rio-Navarro BE, Navarrete-Rodríguez EM, Berber A, Reyes-Noriega N, García-Marcos Álvarez L, García-Almaraz R, et al. The burden of asthma in an inner-city area: A historical review 10 years after Isaac. *World Allergy Organ J.* 2020;13(1).
 23. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature.* 2007;448(7152):470–3.
 24. Thomsen SF. Genetics of asthma: an introduction for the clinician. *Eur Clin Respir J.* 2015;2(1):24643.
 25. Beasley R, Semprini A, Mitchell EA. Risk factors for asthma: Is prevention possible? *Lancet* [Internet]. 2015;386(9998):1075–85. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00156-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00156-7)
 26. Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* [Internet]. 2012;18(5):716–25. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2678>

27. Elisabeth H. Bel. Clinical phenotypes of asthma in Korea. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2004;10(1):44–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749605>
28. Just J, Bourgoin-Heck M, Amat F. Clinical phenotypes in asthma during childhood. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(7):848–55.
29. Akar-Ghibril N, Casale T, Custovic A, Phipatanakul W. Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. 2020;8(2):429–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.11.008>
30. Peters SP. Asthma Phenotypes: Nonallergic (Intrinsic) Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. 2014;2(6):650–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2014.09.006>
31. Gans MD, Gavrilova T. Understanding the immunology of asthma: Pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes. *Paediatr Respir Rev* [Internet]. 2020;36:118–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2019.08.002>
32. Kuruvilla ME, Lee FEH, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(2):219–33.
33. McGregor MC, Krings JG, Nair P, Castro M. Role of biologics in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199(4):433–45.
34. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(5):388–95.
35. Fahy J V. Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):57–65.
36. Pavlidis S, Takahashi K, Kwong FNK, Xie J, Hoda U, Sun K, et al. “T2-high” in severe asthma related to blood eosinophil, exhaled nitric oxide and serum periostin. *Eur Respir J* [Internet]. 2019;53(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.00938-2018>
37. Lambrecht BN, Hammad H, Fahy J V. The Cytokines of Asthma. *Immunity* [Internet]. 2019;50(4):975–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.018>
38. Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res*. 2017;367(3):551–69.
39. Liu G, Philp AM, Corte T, Travis MA, Schilter H, Hansbro NG, et al. Therapeutic targets in lung tissue remodelling and fibrosis. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2021;225:107839. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107839>

40. Yue B. Biology of the Extracellular Matrix. *J Glaucoma* [Internet]. 2014;23(1):S20–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
41. Mostaço-Guidolin LB, Osei ET, Ullah J, Hajimohammadi S, Fouadi M, Li X, et al. Defective fibrillar collagen organization by fibroblasts contributes to airway remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(4):431–43.
42. DeLeon-Pennell KY, Barker TH, Lindsey ML. Fibroblasts: The arbiters of extracellular matrix remodeling. *Matrix Biol* [Internet]. 2020;91–92:1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.05.006>
43. Bara I, Ozier A, Tunon De Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J*. 2010;36(5):1174–84.
44. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* [Internet]. 2012;18(5):684–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2737>
45. Michalik M, Wójcik-Pszczola K, Paw M, Wnuk D, Koczurkiewicz P, Sanak M, et al. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018;75(21):3943–61. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2899-4>
46. Roach KM, Bradding P. Ca²⁺ signalling in fibroblasts and the therapeutic potential of K_{Ca}3.1 channel blockers in fibrotic diseases. 2020;(July 2019):1003–24.
47. Clapham DE. Review Calcium Signaling. 2007;1047–58.
48. Capiod T, Mauger JP, Binet A, Claret M. Regulation of calcium in non-excitable cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1989;1(2):211–4.
49. Ding Z, Yuan J, Liang Y, Wu J, Gong H, Ye Y, et al. Ryanodine receptor type 2 plays a role in the development of cardiac fibrosis under mechanical stretch through TGFβ-1. *Int Heart J*. 2017;58(6):957–61.
50. Chen JB, Tao R, Sun HY, Tse HF, Lau CP, Li GR. Multiple Ca²⁺ signaling pathways regulate intracellular Ca²⁺ activity in human cardiac fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2010;223(1):68–75.
51. Mukherjee S, Kolb MRJ, Duan F, Janssen LJ. Transforming growth factor-β evokes Ca²⁺ waves and enhances gene expression in human pulmonary fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46(6):757–64.
52. Rahman M, Mukherjee S, Sheng W, Nilius B, Janssen LJ. Electrophysiological characterization of voltage-dependent calcium currents and TRPV4 currents in human pulmonary fibroblasts. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(7):L603–14.
53. Saliba Y, Karam R, Smayra V, Aftimos G, Abramowitz J, Birnbaumer L, et al.

- Evidence of a role for fibroblast transient receptor potential canonical 3 Ca²⁺ channel in renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(8):1855–76.
54. Hofmann K, Fiedler S, Vierkotten S, Weber J, Klee S, Jia J, et al. Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(2):560–8.
 55. Bendiks L, Geiger F, Gudermann T, Feske S, Dietrich A. Store-operated Ca²⁺ entry in primary murine lung fibroblasts is independent of classical transient receptor potential (TRPC) channels and contributes to cell migration. *Sci Rep [Internet]*. 2020;10(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-63677-2>
 56. Kong SK, Lee CY. The use of fura 2 for measurement of free calcium concentration. *Biochem Educ [Internet]*. 1995 Apr;23(2):97–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030744129500003L>
 57. Zimmerman KA, Graham L V., Pallero MA, Murphy-Ullrich JE. Calreticulin regulates transforming growth factor- β -stimulated extracellular matrix production. *J Biol Chem*. 2013;288(20):14584–98.
 58. Petecchia L, Sabatini F, Usai C, Carnevali S, Ognibene M, Vanni C, et al. Mechanisms of bradykinin-induced contraction in human fetal lung fibroblasts. *Eur Respir J*. 2010;36(3):655–64.
 59. Homolya L, Watt WC, Lazarowski ER, Koller BH, Boucher RC. Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y₂ receptor (-/-) mice. *J Biol Chem*. 1999;274(37):26454–60.
 60. Janssen LJ, Mukherjee S, Ask K. TRANSLATIONAL REVIEW Calcium Homeostasis and Ionic Mechanisms in Pulmonary Fibroblasts. 2015;53:135–48.
 61. Tiligada E, Ennis M. Histamine pharmacology: from Sir Henry Dale to the 21st century. *Br J Pharmacol*. 2020;177(3):469–89.
 62. Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB, et al. The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: The hunt for new therapeutic targets. *Front Immunol*. 2018;9(AUG):1–9.
 63. Borriello F, Iannone R, Marone G. Histamine release from mast cells and basophils. Vol. 241, *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2017. 1–19 p.
 64. Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2018;2018.
 65. Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WLS, et al. International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. histamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2015;67(3):601–55.

66. Monczor F, Fernandez N. Current knowledge and perspectives on histamine H1 and H2 receptor pharmacology: Functional selectivity, receptor crosstalk, and repositioning of classic histaminergic ligands. *Mol Pharmacol*. 2016;90(5):640–8.
67. Cataldi M, Granata F. Histamine Receptors and Antihistamines : From Discovery. 2014;100:214–26.
68. Di Mauro P, Anzivino R, Distefano M, Borzì DD. Systemic mastocytosis: The roles of histamine and its receptors in the central nervous system disorders. *J Neurol Sci [Internet]*. 2021;427(June):117541. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.117541>
69. Pfeil EM, Brands J, Merten N, Vögtle T, Vescovo M, Rick U, et al. Heterotrimeric G Protein Subunit Gαq Is a Master Switch for Gβγ-Mediated Calcium Mobilization by Gi-Coupled GPCRs. *Mol Cell*. 2020;80(6):940-954.e6.
70. Tomioka M, Ida S, Shindoh Y, Ishihara T, Takishima T. Mast cells in bronchoalveolar lumen of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1984;129(6):1000–5.
71. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 2002;19(5):879–85.
72. Salomonsson M, Malinovsky A, Kalm-Stephens P, Dahlin JS, Janson C, Alving K, et al. Circulating mast cell progenitors correlate with reduced lung function in allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2019;49(6):874–82.
73. Jordana M, Befus AD, Newhouse MT, Bienenstock J, Gauldie J. Effect of histamine on proliferation of normal human adult lung fibroblasts. *Thorax [Internet]*. 1988 Jul 1;43(7):552–8. Available from: <https://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thx.43.7.552>
74. Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem*. 2010;337(1–2):77–81.
75. Salter B, Pray C, Radford K, Martin JG, Nair P. Regulation of human airway smooth muscle cell migration and relevance to asthma. *Respir Res*. 2017;18(1):1–15.
76. Parameswaran K, Janssen LJ, O’Byrne PM. Airway hyperresponsiveness and calcium handling by smooth muscle: A “Deeper Look.” *Chest [Internet]*. 2002;121(2):621–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.121.2.621>
77. Yang Z, Balenga N, Cooper PR, Damera G, Edwards R, Brightling CE, et al. Regulator of G-protein signaling-5 inhibits bronchial smooth muscle contraction in severe asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46(6):823–32.
78. Dale P, Head V, Dowling MR, Taylor CW. Selective inhibition of histamine-evoked Ca²⁺ signals by compartmentalized cAMP in human bronchial airway smooth muscle cells. *Cell Calcium [Internet]*. 2018;71(October 2017):53–64.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.12.002>

79. Janssen LJ, Killian K. Airway smooth muscle as a target of asthma therapy: History and new directions. *Respir Res.* 2006;7:1–12.
80. Ressmeyer AR, Bai Y, Delmotte P, Uy KF, Thistlethwaite P, Fraire A, et al. Human airway contraction and formoterol-induced relaxation is determined by Ca²⁺ oscillations and Ca²⁺ sensitivity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43(2):179–91.
81. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer* [Internet]. 2014;111(6):1021–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.166>
82. Guzmán-Silva A, Vázquez De Lara LG, Torres-Jácome J, Vargaz-Guadarrama A, Flores-Flores M, Said EP, et al. Lung beractant increases free cytosolic levels of Ca²⁺ in human lung fibroblasts. *PLoS One.* 2015;10(7):1–25.
83. Smedler E, Uhlén P. Frequency decoding of calcium oscillations. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2014;1840(3):964–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.015>
84. Santella L. The role of calcium in the cell cycle: Facts and hypotheses. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;244(2):317–24.
85. Byron KL, Villereal ML. Mitogen-induced [Ca²⁺]_i changes in individual human fibroblasts. Image analysis reveals asynchronous responses which are characteristic for different mitogens. *J Biol Chem.* 1989;264(30):18234–9.
86. Ambler SK, Poenie M, Tsien RY, Taylor P. Agonist-stimulated oscillations and cycling of intracellular free calcium in individual cultured muscle cells. *J Biol Chem.* 1988;263(4):1952–9.
87. Ishida S, Matsu-ura T, Fukami K, Michikawa T, Mikoshiba K. Phospholipase C- β 1 and β 4 contribute to non-genetic cell-to-cell variability in histamine-induced calcium signals in HeLa cells. *PLoS One.* 2014;9(1).
88. Wilson C, Zhang X, Lee MD, MacDonald M, Heathcote HR, Alorfi NMN, et al. Disrupted endothelial cell heterogeneity and network organization impair vascular function in prediabetic obesity. *Metabolism.* 2020;111.
89. Bartok A, Weaver D, Golenár T, Nichtova Z, Katona M, Bánsághi S, et al. IP₃ receptor isoforms differently regulate ER-mitochondrial contacts and local calcium transfer. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11646-3>
90. Berra-Romani R, Faris P, Pellavio G, Orgiu M, Negri S, Forcaia G, et al. Histamine induces intracellular Ca²⁺ oscillations and nitric oxide release in endothelial cells from brain microvascular circulation. *J Cell Physiol.* 2020;235(2):1515–30.

91. Leurs R, Smit MJ, Bast A, Timmerman H. Different profiles of desensitization dynamics in guinea-pig jejunal longitudinal smooth muscle after stimulation with histamine and methacholine. *Br J Pharmacol.* 1990;101(4):881–8.
92. Leurs R, Smit MJ, Bast A, Timmerman H. Homologous histamine H1 receptor desensitization results in reduction of H1 receptor agonist efficacy. *Eur J Pharmacol [Internet].* 1991 Apr;196(3):319–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001429999190446W>
93. Smit MJ, Bloemers SM, Leurs R, Tertoolen LGJ, Bast A, de Laat SW, et al. Short-term desensitization of the histamine H1 receptor in human HeLa cells: involvement of protein kinase C dependent and independent pathways. *Br J Pharmacol.* 1992;107(2):448–55.
94. Gutiérrez-Venegas G, Rodríguez-Pérez CE. Toll-like receptor 3 activation promotes desensitization of histamine response in human gingival fibroblasts. Poly (I:C) induces histamine receptor desensitization in human gingival fibroblasts. *Cell Immunol.* 2012;273(2):150–7.
95. Church MK, Church DS. Pharmacology of antihistamines. *Indian J Dermatol [Internet].* 2013 May;58(3):219–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23723474>
96. Veerappan A, O'Connor NJ, Brazin J, Reid AC, Jung A, McGee D, et al. Mast cells: A pivotal role in pulmonary fibrosis. *DNA Cell Biol.* 2013;32(4):206–18.
97. Alonso N, Fernandez N, Notcovich C, Monczor F, Simaan M, Baldi A, et al. Cross-desensitization and cointernalization of H1 and H2 histamine receptors reveal new insights into histamine signal integration. *Mol Pharmacol.* 2013;83(5):1087–98.
98. Xia R, Wang N, Xu Z, Lu Y, Song J, Zhang A, et al. Cryo-EM structure of the human histamine H1 receptor/Gq complex. *Nat Commun [Internet].* 2021;12(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-22427-2>
99. Ekaterini T, Madeleine E. Histamine Receptors as Drug Targets. In 2017. p. 19–22. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6843-5>
100. Soulsby MD, Wojcikiewicz RJH. 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function, ubiquitination and downregulation, but acts with variable characteristics in different cell types. *Cell Calcium.* 2002;32(4):175–81.
101. Peppiatt CM, Collins TJ, Mackenzie L, Conway SJ, Holmes AB, Bootman MD, et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium.* 2003;34(1):97–108.
102. Gambardella J, Morelli MB, Wang X, Castellanos V, Mone P, Santulli G. The discovery and development of IP3 receptor modulators: an update. *Expert Opin*

Drug Discov [Internet]. 2021;16(6):709–18. Available from:
<https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1858792>

103. Nifedipine BF, Mukherjee S, Ayaub EA, Murphy J, Lu C, Kolb M, et al. Disruption of Calcium Signaling in Fibroblasts and Attenuation of. 2015;53(4):450–8.
104. Estrada J, Andrew N, Gibson D, Chang F, Gnad F, Gunawardena J. Cellular Interrogation: Exploiting Cell-to-Cell Variability to Discriminate Regulatory Mechanisms in Oscillatory Signalling. PLoS Comput Biol. 2016;12(7):1–29.