



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LABORATORIO DE NEUROINMUNOLOGÍA

(BIOMEDICINA MED5 217)

Efecto de la histamina en linfocitos obtenidos de bazo de ratón C57BL/6

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOMEDICINA**

PRESENTA:

VILLA CASTILLO MARÍA GUADALUPE

MATRÍCULA:

201824127

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EMMANUEL SESEÑA MÉNDEZ

CODIRECTORA DE TESIS:

DRA. HILDA MINERVA GONZÁLEZ SÁNCHEZ

PUEBLA DE ZARAGOZA, ENERO, 2026

Índice

Abreviaturas	i
Resumen.....	i
1. Antecedentes	2
1.1 Generalidades de los linfocitos	2
1.1.1 Activación de la inmunidad innata.....	3
1.1.2 Distribución de los linfocitos	5
1.1.3 Tipos de respuestas inmunitarias adaptativas	6
1.2 Generalidades de la histamina.....	8
1.2.1 Síntesis y estructura	8
1.2.2 Función	9
1.2.3 Acción	11
1.2.4 Metabolismo de la histamina	11
1.3 Patologías asociadas a la desregulación de histamina sobre los linfocitos.....	13
1.3.1 Histamina en Cáncer y cáncer de mama	13
1.3.2 Enfermedades alérgicas	14
1.4 Enfermedades autoinmunes	14
1.5 Síndrome de Activación de mastocitos (MCAS)	15
1.5.1 Intolerancia a la Histamina	16
1.6 Técnicas de extracción de linfocitos de sangre periférica a partir de las técnicas de Ficoll- paque Plus, Histopaque y Percoll	16
2. Justificación.....	20
3. Planteamiento del problema	21
4. Hipótesis Metodológica	22
4.1 Objetivo de la hipótesis Metodológica.....	22
4.2 Hipótesis Científica	22
5. Objetivos	22
5.1 Objetivo General	22
5.2 Objetivos Particulares	23
6. Material y métodos	24
6.1 Normativa bioética.....	24
6.2 Técnica de Wright	24

6.3	<i>Obtención y cultivos de linfocitos</i>	25
6.4	<i>Evaluación del efecto de histamina sobre los linfocitos cultivados</i>	29
6.5	<i>Análisis de datos</i>	32
7.	Resultados	33
7.1	Aislamiento de células mononucleares	33
7.2	Frotis y Tinción de Wright de células mononucleares	34
7.3	Cultivos de células mononucleares.....	34
7.4	Conteo de células: Tinción azul tripán y cámara de Neubauer	35
7.5	Expansión clonal de linfocitos aislados y cultivados con Histamina	37
7.6	Aplicación de Histamina durante 1, 2 y 4 días	38
7.7	Aplicación de Histamina durante 7 días	42
8.	Discusión.....	45
	¿Por qué los linfocitos se expanden clonalmente al séptimo día?	45
	¿Por qué la histamina no afecta el crecimiento de linfocitos en los días 1,2 y 4?.....	45
9.	<i>Conclusión</i>	48
10.	Referencias	49

Abreviaturas

DAMP	Patrones Moleculares Asociados a Daño
DAO	Diamino Oxidasa
ECL	Células Similares a las Enterocromafines
EM	Esclerosis Múltiple
HNMT	Histamina N-metiltransferasa
IFN-γ	Interferón Gamma
IG	Inmunoglobulina
IgE	Inmunoglobulina E
IL-2	Interleucina 2
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
MCAS	Síndrome de Activación Mastocitaria
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2H-tetrazolio) compuesto tetrazolio que, cuando es metabolizado por células vivas, se reduce a un formazan
NALPs	También conocidas como NLRP. Proteínas con dominio NACHT-, LRR- y PYD- cruciales en la regulación inflamatoria.
NK	Natural Killer
NOD	Dominio de Oligomerización de unión a Nucleótidos
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PRR	Receptores para PAMP
TLR	Receptor Tipo Toll
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TREG	Células T reguladoras

Resumen

Introducción: La histamina se encuentra involucrada en una serie de patologías, todas asociadas en la desregulación de esta; está asociada a cáncer, cáncer de mama, enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunes, Síndrome de Activación de Mastocitos, Intolerancia a la histamina, entre otras. La mayor parte de sus efectos son a través del receptor H1, pero algunos son a través de los receptores H2, H3 y posiblemente a través del receptor H4. La activación de los receptores de histamina en las membranas de los linfocitos puede ayudar a eliminar selectivamente células productoras de anticuerpos, y algunas células reguladoras.

Objetivo: Validar el aislamiento y funcionalidad metabólica de linfocitos obtenidos del bazo de ratón y evaluar el efecto sobre estos ante la aplicación de Histamina.

Material y Métodos: Se probaron 3 distintos protocolos de obtención de cultivos, el #2 fue con el que se obtuvieron mejores resultados (Sugerido por Chaves et al., 2018); por lo tanto, con ese se continuó la investigación. Se utilizaron 6 ratones cepa C57BL/6 divididos en 2 grupos, se les extrajo el bazo, para posteriormente ser incubados con histamina a concentraciones de 0, 10 nM, 100 nM, 300 nM, 1000 nM, 3000 nM, 50 mM, 100 mM y 200 mM, durante 1, 2, 4 y 7 días.

Resultados: Se observó que los linfocitos se expanden clonalmente al séptimo día, debido a que las células ingresaron a un programa de autoexpansión que puede durar varios días, incluso sin estimulación sostenida; por otro lado, que la histamina no afectó el crecimiento de los linfocitos en los cultivos de 1, 2 y 4 días, debido a la dinámica natural de activación de linfocitos; y, finalmente, la histamina sí afectó el crecimiento de linfocitos en el día 7.

Conclusión: El impacto de la histamina sobre la proliferación de los linfocitos depende tanto del tiempo de exposición como del estado de activación celular. Dicho efecto es limitado durante las fases tempranas de activación, pero se vuelve más evidente durante la fase tardía de crecimiento clonal. En conjunto, estos resultados aportan evidencia sobre el papel inmunomodulador de la histamina y destacan la importancia crítica de la cinética de activación de los linfocitos al evaluar los efectos de mediadores químicos en la respuesta inmune adaptativa.

1. Antecedentes

1.1 Generalidades de los linfocitos

Los humanos son considerados un sistema abierto, debido a que el cuerpo debe protegerse de microorganismos potencialmente dañinos, como bacterias, virus, parásitos y otros microbios. Estas defensas se clasifican en dos categorías principales: inmunidad innata (o inespecífica) e inmunidad adaptativa (o específica), tal y como se muestra en la Figura 1 (Abbas et al., 2022). El sistema inmunológico se compone de células efectoras especializadas que identifican y responden a antígenos y otras estructuras moleculares ajenas al tejido humano. Además, incluye diversas moléculas reguladoras, entre ellas una extensa variedad de mediadores solubles conocidos como “citocinas” (Fox, 2023).

La protección contra microorganismos se da mediante una primera reacción de la inmunidad innata, seguida de respuestas posteriores gestionadas por la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata actúa como la primera línea de defensa frente a infecciones y está compuesta por mecanismos celulares y bioquímicos que ya existen en el organismo incluso antes de que ocurra una infección, permitiendo así una respuesta rápida. Estos mecanismos reaccionan exclusivamente ante microorganismos o sustancias derivadas de células dañadas y responden de forma similar cada vez que ocurre una infección (Barrett et al., 2020).

Los principales elementos de la inmunidad innata incluyen:

- **Barreras físicas y químicas:** como los epitelios y las sustancias antimicrobianas en sus superficies.
- **Células fagocíticas y linfocitos NK:** entre ellos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales (NK).
- **Proteínas sanguíneas:** tales como los factores del sistema del complemento y otros mediadores de inflamación.
- **Citocinas:** proteínas que regulan y coordinan diversas funciones de las células involucradas en la inmunidad innata (Abbas et al., 2022).

1.1.1 Activación de la inmunidad innata

El sistema inmunitario innato diferencia entre las células propias del cuerpo y los patógenos invasores mediante el reconocimiento de moléculas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), específicas de los agentes infecciosos. Entre los PAMP más conocidos se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), presentes en la membrana externa de bacterias gramnegativas, y el peptidoglicano, que forma parte de la pared celular de bacterias grampositivas. (Fox, 2023).

Los leucocitos neutrófilos, los monocitos-macrófagos y las células dendríticas poseen receptores que reconocen **patrones moleculares asociados a señales de peligro**, bien procedentes de patógenos (PAMP) o asociados a daño (DAMP) (Paniagua et al., 2017).

Los receptores para PAMP (PRR) se dividen en dos tipos principales:

- **TLR (receptores tipo toll o toll-like receptors):** En mamíferos, se han identificado desde TLR-1 hasta TLR-13, con especificidades distintas para reconocer estructuras de patógenos diferentes y actuar en diversas ubicaciones: la membrana plasmática, el citosol, la membrana endosómica o incluso en fluidos, si se encuentran en forma secretada.
- **NLR (receptores tipo NOD o NOD-like receptors):** Reconocen un conjunto diferente de ligandos, principalmente de bacterias y otros microorganismos, y son exclusivamente intracelulares. Se conocen más de 20 tipos, agrupados en dos familias: NOD (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) y NALP (proteínas con dominio NACHT-, LRR- y PYD- cruciales en la regulación inflamatoria).

Algunos receptores de reconocimiento de patrones (PRR) localizados en la superficie de las células fagocíticas participan directamente en la internalización de microorganismos mediante el reconocimiento de PAMP microbianos. Otros PRR — incluidos varios expresados en membrana y en compartimentos intracelulares—

activan rutas de señalización que favorecen la producción de mediadores inmunomoduladores, como citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) y otros mediadores como las prostaglandinas. Además, los patrones moleculares asociados a daño (DAMP), también conocidos como alaminas, actúan como señales endógenas que se liberan tras daño celular estéril y desempeñan un papel clave en la inducción y amplificación de la respuesta inflamatoria innata (Paniagua et al., 2017).

A diferencia de la inmunidad innata, existen respuestas inmunitarias que se activan con la exposición a microorganismos infecciosos, cuya eficacia y alcance aumentan con cada exposición repetida al mismo microorganismo. Debido a que esta forma de inmunidad surge en respuesta a una infección y se adapta a ella, se conoce como inmunidad adaptativa. Los componentes principales de esta inmunidad son células llamadas linfocitos y sus productos de secreción, los anticuerpos. Por otro lado, las sustancias extrañas que desencadenan una respuesta inmunitaria específica o que se convierten en el objetivo de dicha respuesta se denominan antígenos (Abbas et al, 2022).

Inmunidades innata y adaptativa

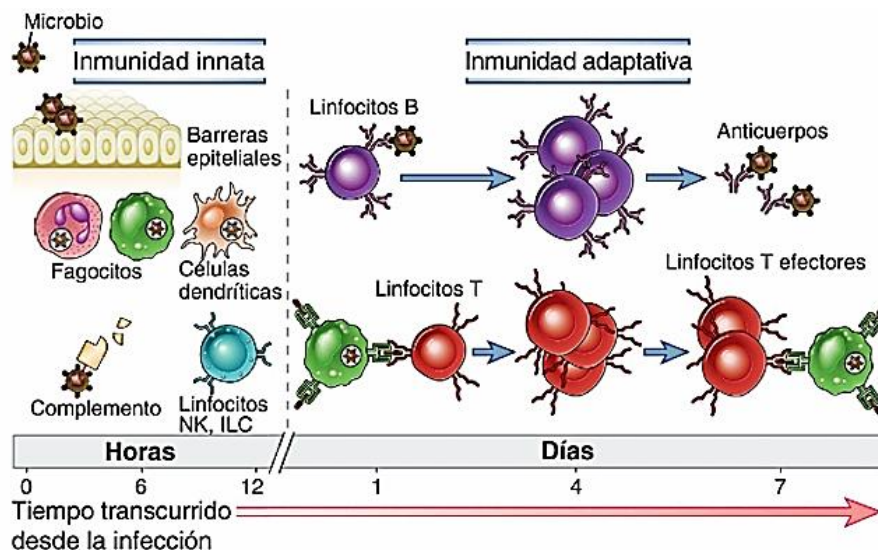


Figura 1. Inmunidades innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata proporcionan la defensa de manera inmediata e inespecífica contra las infecciones o agentes patógenos, mientras que la inmunidad adaptativa aparece después de algunas horas y requieren la activación específica

de los linfocitos (Abbas et al., 2022).

1.1.2 Distribución de los linfocitos

Los linfocitos se encuentran en distintos órganos del cuerpo humano y circulan entre los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea), los órganos linfoides secundarios (como el bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas y las placas de Peyer), así como en órganos no linfoides como la sangre, los pulmones y el hígado (Figura 2). Los linfocitos presentes en la sangre periférica representan solo el 2% del total de linfocitos en el organismo de adultos jóvenes, un porcentaje que no solo varía con la edad, sino también con otros factores como el género, la raza, la medicación y ciertos aspectos ambientales, tales como el estrés, la actividad física, el ritmo circadiano y factores relacionados con el estilo de vida. (Blum et al., 2007).

Distribución de los linfocitos en los distintos órganos

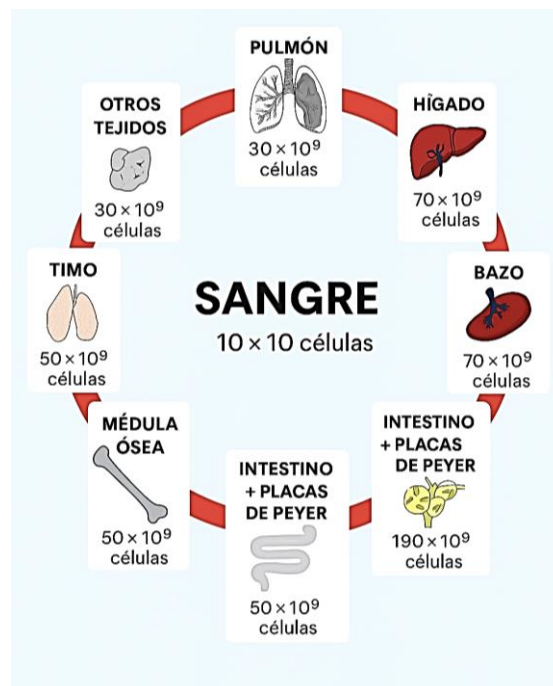


Figura 2. Distribución de los linfocitos en los diferentes órganos. La mayor cantidad de linfocitos se encuentra en los nodos linfoides y el bazo, mientras que en la sangre circulante únicamente se

encuentra aproximadamente sólo el 2% (Tomada y modificada de Blum et al., 2007)

La inmunidad específica se basa en la identificación de moléculas conocidas como antígenos, es decir, sustancias (como aquellas de virus, bacterias y de la superficie de diversas células) que poseen patrones químicos distintos a los del organismo. Este proceso de reconocimiento permite discriminar entre lo propio y lo ajeno, entre lo inofensivo y lo dañino, así como entre lo neoplásico y lo normal, y además incluye la capacidad de generar memoria inmunológica y apoptosis.

El sistema inmunitario está compuesto por:

- **Células linfoides:** linfocitos B, T y NK.
- **Células presentadoras de antígenos:** como los macrófagos y las células dendríticas, que presentan antígenos a los linfocitos.
- **Células fagocíticas:** que incluyen leucocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos.
- **Células secretoras de sustancias letales:** como los leucocitos eosinófilos, basófilos y mastocitos, que se distribuyen en los órganos linfoides y tejidos conjuntivos (Ruiz et al., 2017)

1.1.3 Tipos de respuestas inmunitarias adaptativas

1.- **Inmunidad humoral:** se basa en anticuerpos circulantes del tipo inmunoglobulina, presentes en la fracción globulina de las proteínas plasmáticas. Las inmunoglobulinas son producidas por diversas formas de linfocitos B llamados células plasmáticas, que activan el sistema de complemento y neutralizan los antígenos (Figura 3). Esta inmunidad es fundamental para la defensa contra infecciones bacterianas (antígenos bacterianos extracelulares) y macromoléculas extracelulares libres. Además, en este tipo de inmunidad se generan clones de linfocitos B de memoria, programados para responder ante una segunda exposición al mismo antígeno ((Barrett et al., 2020), (Paniagua et al., 2017)).

2.- **Inmunidad celular:** Mediada por linfocitos T, esta inmunidad es responsable de generar reacciones alérgicas tardías y del rechazo de tejidos trasplantados (Figura

3). También desempeña un papel crucial en la defensa contra infecciones causadas por virus, hongos y ciertas bacterias, como el bacilo de la tuberculosis (Barrett et al., 2020).

Existen 2 tipos principales de linfocitos T:

- **T citotóxicos:** Los linfocitos T citotóxicos, que presentan la glicoproteína CD8, atacan y eliminan las células que llevan el antígeno que los activó. Esto lo logran insertando perforinas que forman poros en la membrana de las células objetivo e inducen apoptosis.

Existen cuatro tipos principales de linfocitos citotóxicos, que varían en sus receptores y funciones: los linfocitos T $\alpha\beta$, los linfocitos T $\gamma\delta$, los linfocitos NK y los linfocitos NKT (Rohana, 2016).

- **T cooperadores / efectores:** Los linfocitos T cooperadores o efectores, que presentan la glicoproteína CD4, potencian la respuesta de otras células inmunitarias, como los linfocitos B, encargados de producir anticuerpos. Se reconocen al menos cuatro subtipos principales de estos linfocitos T cooperadores:
 - **TH1 (T helper 1):** Secretan interleucina-2 (IL-2) e interferón γ , y están principalmente involucrados en la estimulación de la inmunidad celular.
 - **TH2:** Secretan IL-4 e IL-5 y colaboran principalmente con los linfocitos B en el ámbito de la inmunidad humoral.
 - **TH17:** Son activadas en respuesta a infecciones bacterianas, producen IL-6 e IL-17 y participan en el reclutamiento de neutrófilos. También están implicadas en respuestas inflamatorias perjudiciales en enfermedades autoinmunes.

Treg (T reguladoras): Producen IL-10 para atenuar las respuestas inmunitarias impulsadas por los linfocitos T (Barrett et al., 2020).

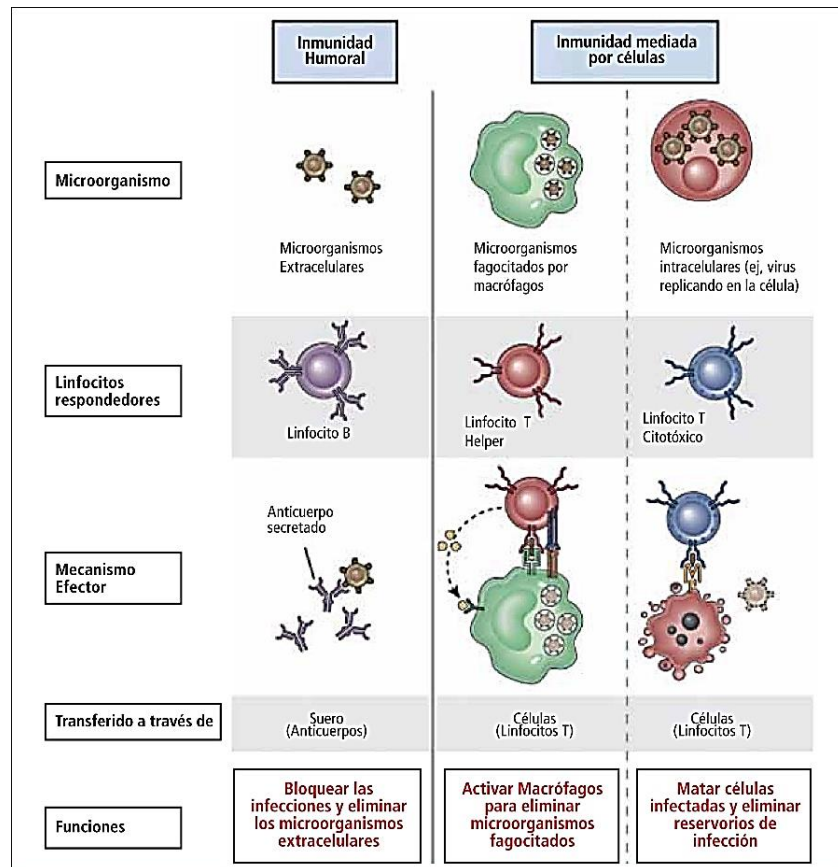


Figura 3. Tipos de inmunidad adaptativa. En la inmunidad humoral participan los linfocitos B, mientras que, en la inmunidad celular participan los linfocitos T (Abbas et al., 2022).

1.2 Generalidades de la histamina

1.2.1 Síntesis y estructura

La histamina (2-[4-imidazolil] etilamina) es una amina bioactiva que se forma a partir de la descarboxilación de su aminoácido precursor (Figura 4), la histidina, en una reacción enzimática descubierta en 1907 por Windaus y Vogt, en la que interviene la enzima L-histidina descarboxilasa (Comas-Basté et al., 2020)

Por su estructura química y grupos funcionales, la histamina se clasifica como una amina heterocíclica, compuesta por un anillo de imidazol y una etilamina, este último un compuesto orgánico que aporta un grupo funcional en forma de amina primaria.

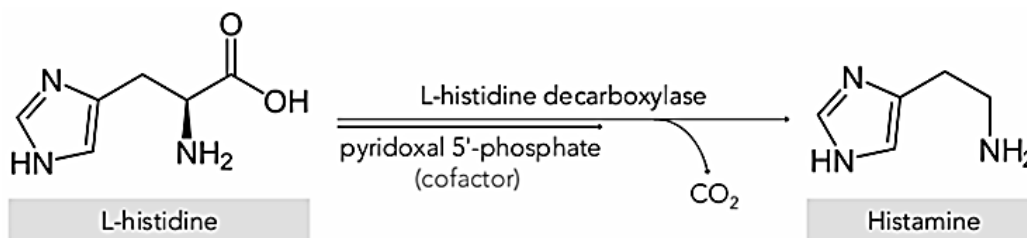


Figura 4. Síntesis de la histamina por una descarboxilación de su aminoácido precursor (Comas-Basté et al, 2020).

1.2.2 Función

La histamina se sintetiza y almacena en altas concentraciones dentro de gránulos secretores, principalmente en basófilos y mastocitos, así como en células enterocromafines del estómago, ganglios linfáticos y el timo (Comas-Basté et al., 2020).

La histamina realiza diversas funciones fisiopatológicas a través de cuatro tipos específicos de receptores acoplados a proteínas G: los receptores de histamina H1 a H4. El receptor H1 (H1R) se encuentra ampliamente distribuido en distintos tejidos, incluyendo células del músculo liso bronquial y vascular (Moriguchi et al., 2020).

En el estómago, las células ECL gástricas liberan histamina en respuesta a la estimulación por gastrina y acetilcolina. La histamina liberada se une al receptor H2 en las células parietales, activando así la secreción de ácido gástrico. Diversos estudios han demostrado que la histamina también tiene una función inmunomoduladora a través de la señalización del receptor H2 (H2R) (Moriguchi et al., 2020).

Los procesos inmunológicos constituyen el principal mecanismo fisiopatológico para

la liberación de histamina desde mastocitos y basófilos. Cuando estas células han sido sensibilizadas por anticuerpos IgE adheridos a sus membranas, se desgranulan rápidamente al entrar en contacto con el antígeno correspondiente; este tipo de liberación también depende de energía y calcio. La desgranulación provoca la liberación simultánea de histamina, trifosfato de adenosina (ATP) y otros mediadores almacenados en los gránulos. La histamina liberada de esta manera actúa como mediador en reacciones alérgicas inmediatas (tipo I), como la fiebre del heno y la urticaria aguda. Además, las sustancias liberadas durante las reacciones inmunes mediadas por IgG o IgM, que activan la cascada del complemento, también provocan la liberación de histamina desde mastocitos y basófilos. (Katzung, 2024)

El receptor H3 de histamina (H3R) actúa como un autorreceptor inhibitor en la membrana presináptica de las neuronas del sistema nervioso central, reduciendo la liberación de histamina y otros neurotransmisores como el glutamato, GABA, dopamina, noradrenalina y acetilcolina. En el sistema nervioso central, la histamina, a través de la actividad de H3R, regula la excitación y la cognición.

Además, se ha descrito el papel de H3R en la respuesta inflamatoria del sistema nervioso, donde participa en el control neurogénico de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la respuesta inflamatoria, ayudando así a reducir la inflamación excesiva en el sistema nervioso central (Moriguchi et al., 2020).

La histamina es uno de los principales mediadores en la anafilaxia tanto en humanos como en ratones, además de desempeñar un papel importante en la respuesta inmune al influir en la secreción de citocinas, la proliferación de células T y las funciones de las células presentadoras de antígenos (APC) (Musio et al., 2006).

El receptor H4 de histamina (H4R) se expresa principalmente en células inmunocompetentes, como mastocitos, eosinófilos, monocitos, células dendríticas y células T. El receptor H4 facilita la quimiotaxis de células inmunes y participa en las respuestas alérgicas e inflamatorias. Se ha comprobado que los antagonistas de H4R poseen efectos antiinflamatorios y antialérgicos en modelos preclínicos de asma, colitis, dermatitis y artritis.

1.2.3 Acción

Los principales sitios de acción de la histamina se encuentran en la piel y el cerebro, y su efecto varía en cada uno. En la piel, la histamina es liberada principalmente por mastocitos y se une a los receptores H1 en las células endoteliales de los microvasos, lo que provoca picazón, ronchas y enrojecimiento, como ocurre en la urticaria. En el cerebro, en cambio, la histamina es liberada por neuronas activadas (neuronas histaminérgicas) y actúa sobre los receptores H1 en áreas como el cerebro, el cerebelo y la médula espinal, funcionando como neurotransmisor. Esto genera efectos fisiológicos clave, como el mantenimiento del estado de alerta, el incremento de la actividad locomotora, el fortalecimiento de la memoria y el aprendizaje, la supresión del apetito y la reducción de las convulsiones (Fukasawa et al., 2022)

Los mastocitos y basófilos son las principales fuentes celulares de histamina. En estas células, la L-histidina es convertida en histamina a través de una descarboxilación realizada por la enzima histidina descarboxilasa (HDC) en el aparato de Golgi; posteriormente, la histamina se almacena en gránulos citoplasmáticos. Los mastocitos y basófilos se sensibilizan y luego se degranulan, liberando histamina. Se ha comprobado que los mastocitos se encuentran en la piel, los intestinos y otras áreas, lo que indica una alta concentración de histamina en estas zonas (Zhao et al., 2022).

1.2.4 Metabolismo de la histamina

La histamina se metaboliza a través de dos rutas principales: mediante la acción de la enzima histamina-N-metiltransferasa (HNMT) y la desaminación oxidativa mediada por la DAO. Bajo la acción de HNMT, una porción menor de la histamina se transforma en N-metilhistamina, que posteriormente se convierte principalmente en ácido N-metilimidazolio acético con la ayuda de la monoaminoxidasa (Figura 5). La mayor parte de la histamina, sin embargo, se transforma en ácido imidazol acético con la intervención de DAO. Aproximadamente dos tercios de este ácido imidazol acético se une a ribosa y se elimina en la orina, mientras que el resto se

excreta sin modificación. Alrededor del 2-3% de la histamina se excreta sin cambios en la orina. HNMT es una lipoproteína soluble intracelular, encargada de procesar la histamina dentro de las células, mientras que DAO es una proteína secretada, responsable de la eliminación de la histamina en el espacio extracelular.

Además, se ha encontrado que el alcohol, especialmente el vino tinto, y el acetaldehído pueden incrementar la liberación de histamina endógena e interferir de manera competitiva con la enzima acetaldehído deshidrogenasa, reduciendo la velocidad de metabolismo de la histamina, lo que contribuye a elevar los niveles de histamina en el organismo (Zhao et al., 2022).

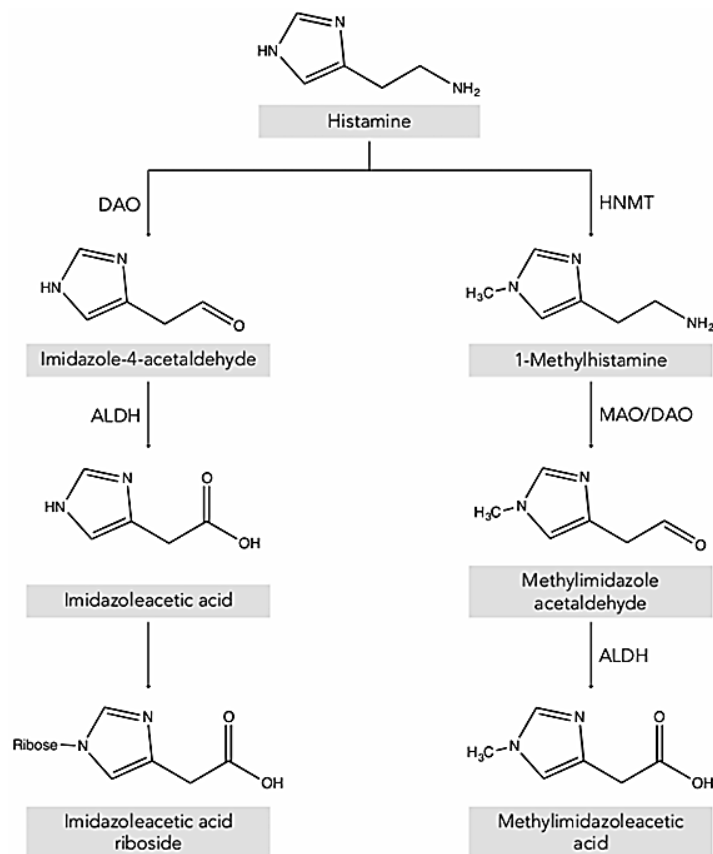


Figura 5. Se conocen dos vías metabólicas principales de la histamina en humanos, que involucran las enzimas diaminoxidasa (DAO) e histamina-N-metiltransferasa (HNMT) (Comas-Basté et al, 2020).

1.3 Patologías asociadas a la desregulación de histamina sobre los linfocitos

1.3.1 Histamina en Cáncer y cáncer de mama

Niveles elevados de histamina y de receptores de histamina (H1R-H4R) se han encontrado en diversos tipos de células tumorales y en células del microambiente tumoral, lo que sugiere su rol en la progresión tumoral. La histamina es uno de los principales mediadores involucrados en las respuestas inflamatorias e inmunitarias. Sus principales fuentes celulares incluyen mastocitos, basófilos, neuronas histaminérgicas y células enterocromafines gástricas, aunque también se liberan pequeñas cantidades desde células epiteliales y células T.

Asimismo, la presencia elevada de histamina y de sus receptores en múltiples tipos de cáncer apunta a su participación en la compleja biología del cáncer (Comas-Basté et al., 2020).

Se han encontrado concentraciones elevadas de histamina en varias neoplasias malignas humanas, como el cáncer colorrectal, de mama y el melanoma maligno, así como en numerosos carcinomas experimentales, lo cual sugiere que la histamina juega un rol en la biología del cáncer. Además, los niveles de histamina en sangre de pacientes con tumores sólidos recién diagnosticados son casi tres veces superiores a los de individuos sanos o con enfermedades no cancerosas. Tras la extirpación quirúrgica de la neoplasia maligna, los niveles de histamina permanecen elevados durante aproximadamente dos meses, normalizándose tres meses después de la cirugía. Estos hallazgos indican que la síntesis de histamina podría incrementarse en presencia de un tumor (Comas-Basté et al., 2020).

Dentro de la complejidad del cáncer, es fundamental que las terapias efectivas se dirijan a los diversos participantes moleculares presentes en un tumor, así como a sus interacciones específicas con el microambiente tumoral. En este contexto, la histamina, un compuesto con múltiples funciones, podría representar un agente terapéutico prometedor en la lucha contra el cáncer. La aprobación del diclorhidrato de histamina en Europa para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, administrado en combinación con el inmunoterapéutico IL-2, respalda la investigación de esta amina biogénica como un coadyuvante en estrategias

terapéuticas para otros tipos de cáncer (Zhao et al., 2022).

1.3.2 Enfermedades alérgicas

Las enfermedades alérgicas, como el asma bronquial, la rinitis alérgica y la dermatitis atópica, están estrechamente asociadas a una respuesta inmune polarizada hacia el perfil Th2, en la cual la histamina cumple un papel central. Durante la activación de mastocitos y basófilos, se libera gran cantidad de histamina, que interactúa principalmente con los receptores H1 y H2 expresados en linfocitos T. Esta señalización favorece la diferenciación hacia el fenotipo Th2, caracterizado por la producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Dichas citocinas promueven la activación de eosinófilos y células B, así como la síntesis de inmunoglobulina E (IgE). La IgE, al sensibilizar nuevamente a los mastocitos, establece un circuito de retroalimentación que amplifica la respuesta alérgica.

Ejemplo clínico: En pacientes con asma alérgico se ha observado un aumento en la expresión de receptores H1 en linfocitos CD4+ presentes en las vías respiratorias, lo que contribuye a una inflamación más intensa y a la exacerbación de los síntomas (Akdis et al., 2003).

1.4 Enfermedades autoinmunes

En condiciones autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) o la esclerosis múltiple (EM), se ha observado que los receptores de histamina, principalmente H2 y H4, están involucrados en la regulación de la activación de linfocitos autorreactivos.

Una estimulación exacerbada de estos receptores puede iniciar alteraciones en la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en las células presentadoras de antígenos. Este fenómeno facilita la presentación de autoantígenos, lo que favorece la activación sostenida de linfocitos T autorreactivos y contribuye a la progresión del proceso autoinmune.

En el contexto del LES, se ha identificado que la IL-10, aunque tradicionalmente

considerada una citocina antiinflamatoria, puede tener un papel dual, contribuyendo tanto a la regulación como a la promoción de respuestas autoinmunes, dependiendo del contexto inmunológico ((Del Río et al., 2012), (Aldossari et al., 2023)).

1.5 Síndrome de Activación de mastocitos (MCAS)

El síndrome de activación mastocitaria (MCAS, por sus siglas en inglés) es un trastorno inmunológico caracterizado por la liberación inapropiada o excesiva de mediadores inflamatorios —principalmente histamina, pero también triptasa, prostaglandinas y leucotrienos— por parte de los mastocitos. Esta desregulación puede afectar diversos sistemas del organismo, como la piel, el tracto gastrointestinal, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso, produciendo un conjunto de manifestaciones clínicas de carácter multisistémico.

Además de sus efectos locales en los tejidos, la histamina también modula la respuesta inmunitaria adaptativa. A través de la activación del receptor H4, puede influir en la migración y el reclutamiento de linfocitos T y B hacia sitios inflamados, promoviendo respuestas inmunes desorganizadas que pueden asemejarse a las observadas en enfermedades alérgicas y en ciertos trastornos autoinmunes.

Las manifestaciones clínicas frecuentes en el MCAS incluyen:

- Urticaria crónica y angioedema
- Síntomas gastrointestinales, como diarrea, dolor abdominal y náuseas
- Episodios de hipotensión y taquicardia, característicos de la activación sistémica de mastocitos
- Alteraciones neurocognitivas, comúnmente descritas como “niebla mental”

El MCAS comparte características clínicas con enfermedades autoinmunes y alérgicas, lo que puede dificultar su diagnóstico. Por ello, su reconocimiento, diferenciación y abordaje adecuado son fundamentales para mejorar el manejo clínico y la calidad de vida de las personas afectadas (Valent et al., 2012; Özdemir et al., 2024).

1.5.1 Intolerancia a la Histamina

La intolerancia a la histamina no es una respuesta inmunológica típica, sino una deficiencia en la degradación de histamina, principalmente por baja actividad de la enzima diamina oxidasa (DAO) en el intestino delgado. Esta enzima es responsable de metabolizar la histamina exógena proveniente de alimentos o producida por la microbiota intestinal. Cuando la actividad de la DAO se ve comprometida, ya sea por factores genéticos, enfermedades gastrointestinales, disbiosis o ciertos medicamentos, se produce una acumulación de histamina en el organismo, lo que puede desencadenar una variedad de síntomas.

El exceso de histamina en el organismo puede afectar el sistema inmunológico, modulando la inmunidad innata y adaptativa. A través de receptores específicos como el H4, influencia en la activación de linfocitos T, B, y otras células inmunitarias como células dendríticas y monocitos, lo que puede dar lugar a respuestas inmunitarias disfuncionales y exacerbar condiciones inflamatorias subyacentes.

La intolerancia a la histamina se presenta con síntomas como urticaria, migrañas, fatiga, y problemas gastrointestinales, confundiendo a menudo con alergias o enfermedades autoinmunes. El manejo implica una dieta baja en histamina y posible suplementación con DAO, lo que requiere una evaluación médica adecuada para un diagnóstico correcto (Shulpekova et al., 2021; Branco et al., 2018).

1.6 Técnicas de extracción de linfocitos de sangre periférica a partir de las técnicas de Ficoll-paque Plus, Histopaque y Percoll

Histopaque-1077 es ideal para aplicaciones clínicas o diagnósticas donde se requiere un método rápido, estandarizado y reproducible con mínima manipulación.

Percoll es más adecuado para trabajos de investigación donde se necesita flexibilidad, mayor control del gradiente, o separación de subpoblaciones celulares específicas.

Ficoll paque plus se utiliza principalmente para el aislamiento de células mononucleares (linfocitos y monocitos) de la sangre humana, para estudios *in vitro*.

Estos son los tres medios de gradiente de densidad más utilizados para la separación de células mononucleares como linfocitos.

A continuación, se mencionarán sus similitudes y diferencias, basados en el protocolo de uso y descripción de Sigma-Aldrich.

Similitudes

Categoría	Descripción
Uso en investigación biomédica	Son ampliamente usados en cultivo celular, ensayos inmunológicos y estudios funcionales de infocitos.
Tipo de separación	Los tres utilizan el gradiente de densidad para separar células, aprovechando que cada tipo celular tiene una densidad diferente.
Aplicación en inmunología	Estos métodos se emplean para aislar células mononucleares (linfocitos, monocitos) y excluir
Centrifugación	Requieren centrifugación sin freno a temperaturas ambiente (~400 xg por ~30 minutos). En los tres casos, la separación ocurre tras una centrifugación diferencial, donde las células de interés forman un anillo en la interfase del gradiente.
Resultado esperado	Los linfocitos se recuperan en la interfase del gradiente, separados de eritrocitos y granulocitos.
Método no citotóxico y versatilidad	No destruyen las células, permitiendo que se mantengan viables y funcionales para posteriores ensayos. Aunque estos 3 métodos tienen diferentes densidades, pueden ajustarse o seleccionarse según el tipo de muestra: sangre periférica, bazo, médula ósea o timo.

Diferencias

Característica	Histopaque-1077	Percoll	Ficoll-paque
Composición	Polisacarosa (57g/L) + Diatrizoato de sodio (90 g/L)	Partículas coloidales de sílice recubiertas con PVP	Polisacárido hidrofílico (Ficoll 400) + medio denso (diatrizoato de sodio)
Preparación	Listo para usar; no requiere preparación previa.	Requiere preparación de gradiente (por ejemplo 70% y 30%) con PBS y FBS o albúmina.	Listo para usar, no requiere preparación previa.
Osmolaridad	Isoosmótico por formulación comercial	Se debe ajustar manualmente la osmolaridad para mantener la viabilidad celular	Isoosmótico por formulación comercial
Aplicaciones clínicas	Usado frecuentemente en tipificación HLA, citometría básica y ensayos de rutina.	Más flexibles para ajustes personalizados en investigación avanzada.	Usado en hematología, inmunología y trasplantes.
	Similar a Ficoll, pero menor	Más laborioso; requiere	Puede arrastrar plaquetas; limitado

Limitaciones	estandarización internacional.	preparación del gradiente, lo puede generar estrés osmótico si no se prepara correctamente.	a densidad fija.
Tipo de gradiente	Gradiente de densidad discontinua preformado	Puede ser discontinuo o continuo, según se requiera.	Gradiente de densidad discontinua preformado
Ventajas	Económico, fácil acceso, resultados comparables a Ficoll.	Gran flexibilidad en densidades permite aislar distintos subtipos celulares.	Alta reproductibilidad, estándar en inmunología clínica e investigación.

2. Justificación

La biomedicina, en tanto disciplina interdisciplinaria, busca desarrollar soluciones que mejoren la comprensión, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, integrando principios de la biología, medicina, bioquímica, entre otras. Dentro de este contexto, es fundamental la participación activa por parte de los profesionales de esta área en la investigación biomédica básica, especialmente en temáticas relacionadas con el sistema inmunológico, dado su papel central en la salud, así como en el desarrollo de enfermedades crónicas e inflamatorias.

La histamina, una amina biógena conocida principalmente por su participación en reacciones alérgicas e inflamatorias, también ejerce efectos moduladores sobre diversas células inmunitarias, incluidos los linfocitos (Comas-Basté et al., 2020). Sin embargo, los mecanismos precisos mediante los cuales la histamina influye en la respuesta inmune aún no se comprenden completamente. Esta laguna en el conocimiento limita el desarrollo de estrategias terapéuticas más precisas en enfermedades con componentes inmunológicos, como las alergias, la autoinmunidad o la tolerancia a la histamina.

El estudio del efecto de la histamina sobre los linfocitos desde la perspectiva de la biomedicina es particularmente relevante, ya que permite abordar el fenómeno desde una visión integradora y cuantitativa, utilizando herramientas experimentales, analíticas y tecnológicas que pueden aportar nuevos enfoques a la inmunología celular.

Además, comprender estas interacciones contribuye a establecer parámetros fisiopatológicos útiles en el diseño de dispositivos diagnósticos, sistemas de cultivo celular, modelos computacionales o terapias dirigidas.

Por tanto, esta investigación no solo representa una aportación al conocimiento científico, sino que también refuerza el papel de la biomedicina como disciplina capaz de generar soluciones innovadoras a problemas de salud complejos, consolidando el perfil del profesional biomédico como puente entre la investigación básica y la aplicación clínica.

3. Planteamiento del problema

La histamina es una amina biógena reconocida por su papel en reacciones alérgicas y anafilácticas; sin embargo, también participa de manera activa en la regulación del sistema inmunitario. Sus efectos se ejercen a través de receptores específicos (H1, H2, H3 y H4), expresados en diversas células inmunitarias, incluidos los linfocitos T y B. Estas células son esenciales en la inmunidad adaptativa: los linfocitos T coordinan las respuestas celulares y reguladoras, mientras que los linfocitos B producen anticuerpos responsables de la inmunidad humoral.

Diversos estudios sugieren que la histamina puede modular procesos como la proliferación, la diferenciación y la secreción de citocinas en linfocitos. Dependiendo de la concentración, el tipo de receptor y el microambiente, puede inducir respuestas proinflamatorias, favorecer perfiles Th2 vinculados a alergias, o incluso promover mecanismos de tolerancia e inmunosupresión mediados por células reguladoras. No obstante, el conocimiento actual sobre esta modulación en condiciones fisiológicas y patológicas es poco integrativo.

La falta de claridad en los mecanismos mediante los cuales la histamina influye en los linfocitos representa un obstáculo para comprender fenómenos inmunológicos de manera integral, lo cual limita, su modulación como un blanco terapéutico eficiente en patologías como alérgicas, autoinmunes, inflamatorias crónicas y procesos oncológicos.

En este contexto, surge la necesidad de investigar de qué manera la histamina regula la función de los linfocitos T y B, tanto de manera aguda como de manera crónica, con el fin de aportar evidencia que contribuya a una comprensión más integral de los mecanismos de control inmunológico y abra la posibilidad de explorar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

4. *Hipótesis Metodológica*

El aislamiento y cultivo de linfocitos obtenidos de bazo de ratón mediante tres técnicas diferentes: 1) la sugerida por la Dra. Hilda González, De acuerdo con los protocolos estandarizados del laboratorio de Inmunoterapia del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, 2) la sugerida por Chaves et al, 2018 y 3) la Técnica de Ficoll (Godoy, 2019), sin estimulantes adicionales ofrecen la misma cantidad de linfocitos para su posterior estudio.

4.1 *Objetivo de la hipótesis Metodológica*

1. Validar el aislamiento, viabilidad y número de células mononucleares (entre ellas los linfocitos) en cultivos obtenidos del bazo de ratón comparando tres técnicas diferentes.
2. Contabilizar el número de células mononucleares (entre ellas los linfocitos) haciendo uso de la Tinción por Azul Tripan y la cámara de Neubauer.
3. Determinar si alguna de las tres técnicas sugeridas para aislamiento y cultivo de linfocitos es mejor que las otras dos.

4.2 *Hipótesis Científica*

Los linfocitos cultivados a partir de bazo de ratón siguiendo la técnica de Chaves et al., 2018 sin estimuladores adicionales, aumentan su número ante la exposición a Histamina.

5. *Objetivos*

5.1 *Objetivo General*

Validar el aislamiento y funcionalidad metabólica de linfocitos obtenidos del bazo de ratón y evaluar el efecto sobre estos ante la aplicación de Histamina.

5.2 Objetivos Particulares

1. Comprobar morfológicamente, mediante frotis y la tinción de Wright, el aislamiento adecuado de las células mononucleares (entre ellas los linfocitos).
2. Realizar cultivos de 24 h, 48 h, 4 y 7 días de las células mononucleares aisladas del bazo de ratón.
3. Validar la viabilidad de las células mononucleares (entre ellas los linfocitos) de bazo de ratón mediante la técnica de MTS.
4. Evaluar la expansión clonal de linfocitos aislados ante la aplicación de histamina a través de la técnica de MTS.

6. *Material y métodos*

6.1 *Normativa bioética*

Todos los experimentos que se realizarán en este protocolo se sujetan a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, la cual habla acerca de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, tomando en consideración los apartados de movilización, técnicas experimentales, eutanasia y medidas de bioseguridad y salud ocupacional para el personal involucrado con la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Así como también el uso de la Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, la cual establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo, esterilización, especificaciones y etiquetado. Asimismo, se respetaron los lineamientos del Bioterio establecidos por el Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública.

6.2 *Técnica de Wright*

La técnica de Wright es una tinción hematológica, que facilita la diferenciación de los tipos de células presentes en la muestra de sangre a estudiar.

Esta técnica se realizó en todos los experimentos, en 3 ocasiones; la primera, fue una vez macerado el bazo, se tomó una gota de muestra, se colocó en un portaobjetos para posteriormente realizar un frotis y en seguida la tinción de Wright; la segunda, se realizó posterior a los lavados y centrifugaciones correspondientes, es decir, una vez que se habían eliminado restos de otras células que no fueran mononucleares; y la última, se realizó una vez cultivados los linfocitos con RPMI 10%.

De manera breve, esta tinción consistió en; dejar secar el frotis realizado, cubrir con metanol y dejar secar a temperatura ambiente, una vez seco se agregó colorante de Wright, durante 15 minutos, posteriormente se lavó de manera delicada con agua del lavabo y se dejó secar a temperatura ambiente.

Finalmente, para fijar se agregó una gota de aceite de inmersión en el campo más azul del portaobjetos y se colocó el cubreobjetos.

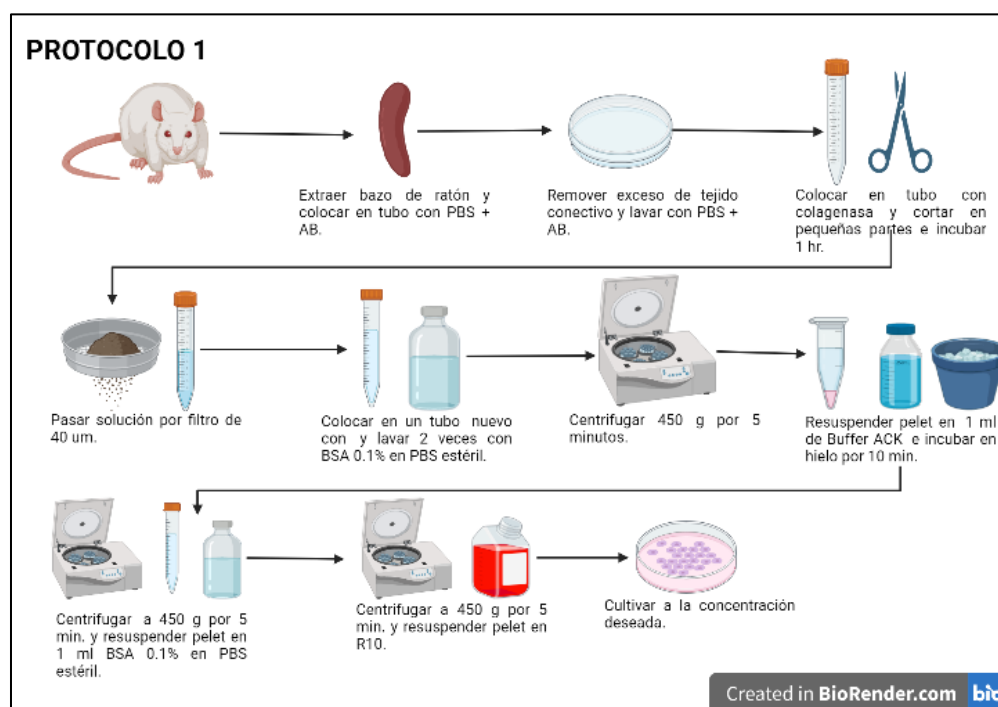
6.3 Obtención y cultivos de linfocitos

Para este trabajo, primero, se probaron 3 distintos protocolos para la obtención de linfocitos de bazo de ratón, utilizando un ratón *Mus musculus* cepa C57BL/6 de entre 10-12 días de edad por protocolo. El primero, proporcionado por la Dra. Hilda González; el segundo de (Chaves et al, 2018) y el tercero de (Godoy, 2019).

Descriptivos

PROTOCOLO 1:

Los pasos para seguir se muestran sintetizados en la siguiente imagen y se describen a continuación de la misma

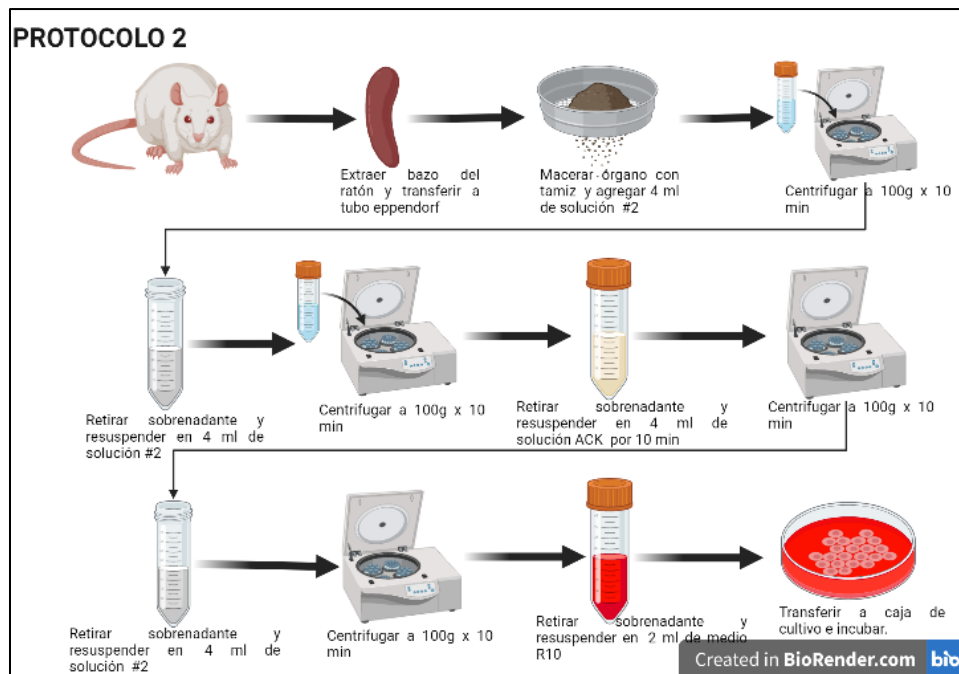


1.- Se anestesió al ratón y posteriormente se realizó una dislocación cervical como segundo método de eutanasia. Luego, se desinfectó con etanol al 70%, la zona cercana a la incisión en el costado izquierdo del animal. Bajo una técnica aséptica, se realizó una incisión vertical de aproximadamente 1.5 cm en el cuadrante abdominal superior izquierdo, justo por debajo de las costillas. Cuidadosamente se extrajo el bazo, y se eliminó todo el tejido conectivo o grasa que tuviera adherido.

- 2.- El bazo se transfirió a un tubo con 1 ml de PBS 1x estéril más 10% de antibiótico (estreptomycin)
- 3.- En un gabinete de bioseguridad, se colocó el bazo en una placa Petri estéril y se le removió el exceso de tejido conectivo con las pinzas. Posteriormente, se lavó con PBS 1x + AB
- 4.- Una vez lavados, el bazo se colocó en un tubo con 1 mg/ml de colagenasa I, y con ayuda de unas tijeras de tritura, dejándolo en piezas pequeñas, y este se incubó 1 hr a 37°C.
- 5.- Esta suspensión, se pasó por un filtro de 40µm, recolectándola en un tubo nuevo
- 6.- Se lavó 2 veces, agregando 1 ml de BSA al 0.1% en PBS 1x estéril
- 7.- Se centrifugó a 450 g durante 5 min.
- 8.- El pélet se resuspendió en 1 ml de Buffer de lisis de glóbulos rojos (ACK), la cual contiene: KHCO_3 , NH_4Cl y Na_2EDTA ; y se dejó en hielo durante 10 minutos.
- 9.- Se centrifugó el tubo a 450g por 5 min y se re suspendió el pélet en 1 ml de BSA 0.1% en PBS 1x estéril.
- 10.- Se Centrifugó el pélet a 450g por 5 min y se re-suspendió en 1-2 ml de medio R10 (Medio RPMI + 10% SFB).
- 11.- Las células se incubaron a 37°C , 5% CO_2

PROTOCOLO 2:

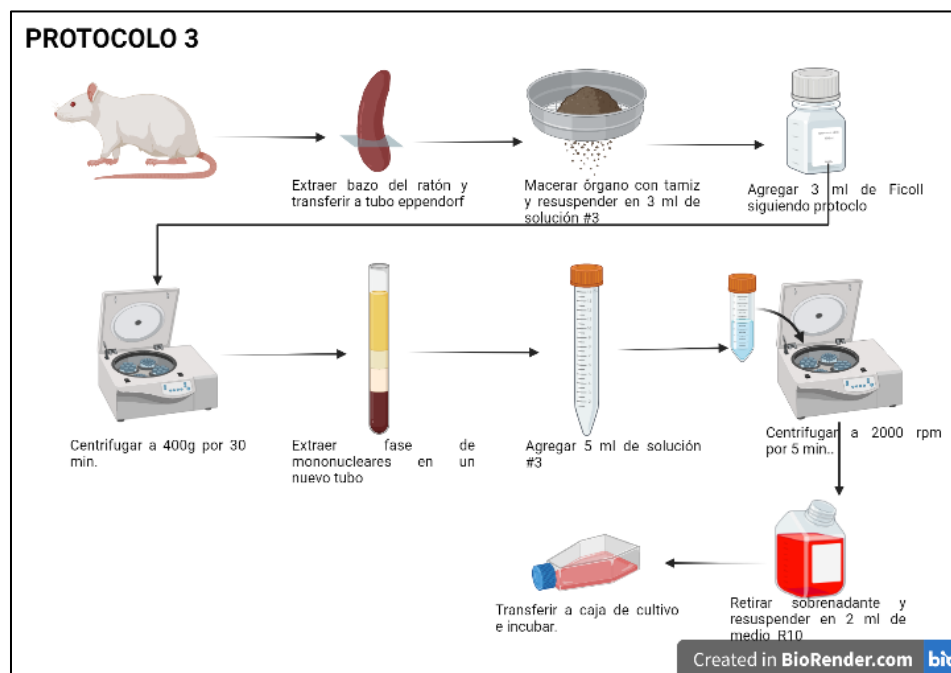
Los pasos para seguir se muestran sintetizados en la siguiente imagen y se describen a continuación de la misma



- 1.- Se realizó el mismo procedimiento del paso 1 del protocolo anterior.
- 2.- El bazo se transfirió a un tubo estéril eppendorf con 1 ml de la solución #1(la cual contenía RPMI + 5% de penicilina-estreptomicina).
- 3.- Se maceró el órgano a través de un tamiz de 100 μ m y se agregaron 4 ml de solución #2, (la cual contenía: PBS 1x estéril + 2% de SFB + 2 mM de EDTA)
- 4.- Se centrifugó a 100g por 10 min. (este procedimiento 2 veces).
- 5.- Se retiró sobrenadante y el pélet se resuspendió en 4 ml de solución ACK por 10 min., y se centrifugó a 100g por 10 min.
- 6.- El pélet se resuspendió en 4 ml de solución #2,y se centrifugó a 100g por 10 min
- 7.- Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pélet en 2 ml de medio R10 (medio RPMI + 10% SFB).
- 8.- Se cultivó en una placa, dividiéndolo en 2 pozos, e se incubó a 37°C , 5% CO₂.

PROTOCOLO 3:

Los pasos para seguir se muestran sintetizados en la siguiente imagen y se describen a continuación de la misma



1-3: Estos 3 pasos, se realizaron igual que el protocolo 2; únicamente, en lugar de ser con solución #2, fue con la #3, que contenía: PBS 1x estéril + 3% SFB.

4.- En un tubo nuevo, se agregaron 3 ml de ficoll, siguiendo el protocolo de ficoll (3ml ficoll x 4 ml de sangre); y se le fue agregando poco a poco la solución anterior, sin que se mezclen.

5.- Se centrifugó a 400g por 30 minutos.

6.- Se tomó la capa de mononucleares (segunda capa), se transfirió a un tubo nuevo estéril, y se le agregó 5 ml de la solución #3 y se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos.

7.- Se retiró el sobrenadante y el pélet se resuspendió en 1 ml de medio R10 (medio RPMI + 10% SFB).

8.- Se cultivó en una placa de 6 pozos, e incubó a 37°C, 5% CO₂.

De los tres protocolos, en el protocolo 1 hubo muy poca recuperación, se estima

que de un 5 al 10% de linfocitos normalmente encontrados en el bazo de ratón.

En el protocolo 2, se contaron con azul tripán y una cámara de Neubauer (dilución 1:1), un aproximado de 38.8 millones de células con el 78% de viabilidad (viabilidad normal); mientras que, para el protocolo 3, fueron 4.74 millones con el 97% de viabilidad (excelente viabilidad).

Después de los resultados obtenidos, se determinó usar el protocolo 2 para este trabajo, ya que es con el que más células se recopilaron y mejor viabilidad obtuvo.

De estos 3 protocolos probados, en base a los resultados obtenidos, decidimos quedarnos con el protocolo 2 para la evaluación con histamina.

Se llevo a cabo el protocolo 2 en 6 ratones, divididos en 2 rondas (3 ratones en cada una).

6.4 Evaluación del efecto de histamina sobre los linfocitos cultivados

Posterior a la separación de los linfocitos, se dejaron en medio de cultivo, incubando durante 2 horas, esto con el propósito, de que se asentara el mayor número posible, de todas aquellas células que no fueran linfocitos.

Posteriormente, con una micropipeta, se tomó todo el sobrenadante de la caja de cultivo, sin tocar la base, y se colocó en un tubo de 5 ml. De ese sobrenadante, se tomaron 10 μ L y otros 10 μ L de azul tripán, se colocaron en una placa de cultivo completamente limpia y esterilizada; se homogenizó la mezcla, se colocó en una cámara de Neubauer y se procedió al conteo bajo el microscopio.

De los 6 ratones utilizados, estos fueron los resultados:

Conteo de células mononucleares haciendo uso de la tinción azul tripán y la cámara de Neubauer.

Número de ratón	Viabilidad	Células obtenidas
1	81%	21.4×10^6
2	83%	1.42×10^6

3	88%	11.5×10^6
4	84%	23.24×10^6
5	33%	1.30×10^6
6	80%	22.4×10^6

Una vez contadas las células, la muestra se centrifugó a 100g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante, y el pélet se resuspendió en medio R10 en los siguientes ml:

Número de ratón	MI de medio R10
1	3.5
2	2.5
3	2
4	5.8
5	600 μ L
6	5.6

Se realizó un stock de histamina, tomando 450 μ L de medio R10 + 50 μ L de histamina, teniendo así una dilución 1:10 y un volumen final de 500 μ L.

De cada ratón se incubaron 200,000 células por pozo, a excepción del ratón número 2, de ese se incubaron 35,000 células por pozo debido a la baja cantidad de linfocitos obtenidos. La incubación se realizó en placas de 96 pozos, esto porque este tipo de placas facilita la lectura con MTS que posteriormente se realizó.

Las incubaciones fueron a 24 hrs, 48 hrs, 4 días y 7 días. Para los primeros 3 ratones, se administraron concentraciones de 0, 50, 100 y 200 mM de histamina; sin embargo, para los ratones 4, 5 y 6 se agregaron concentraciones extras debido a la alta cantidad de células obtenidas. Las concentraciones fueron las siguientes:

RESULTADOS

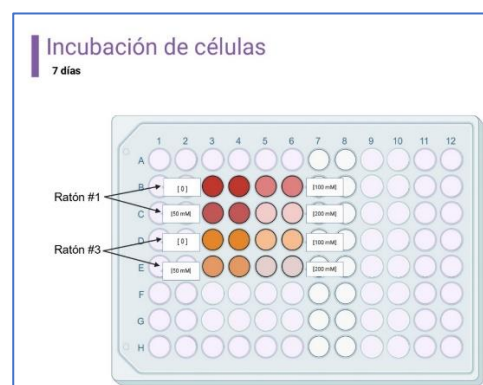
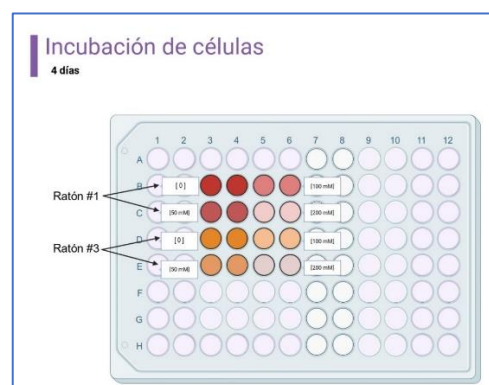
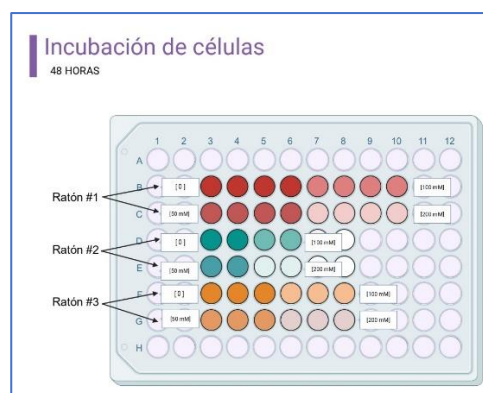
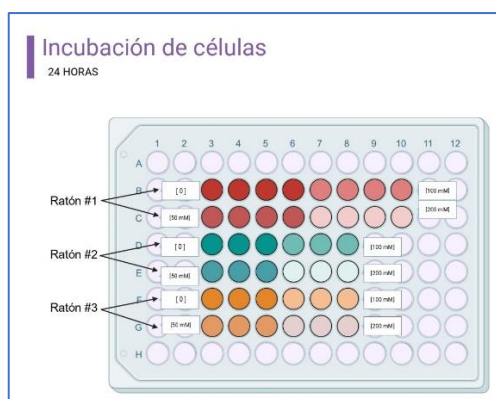
0, 10 nM, 100 nM, 300 nM, 1000 nM, 3000 nM, 50 mM, 100 mM y 200 mM de histamina.

Para poder incubar esa cantidad de células, se tomaron los siguientes μL de cada muestra para cada pozo:

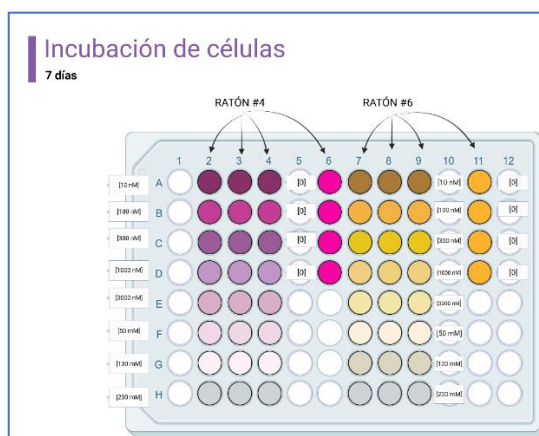
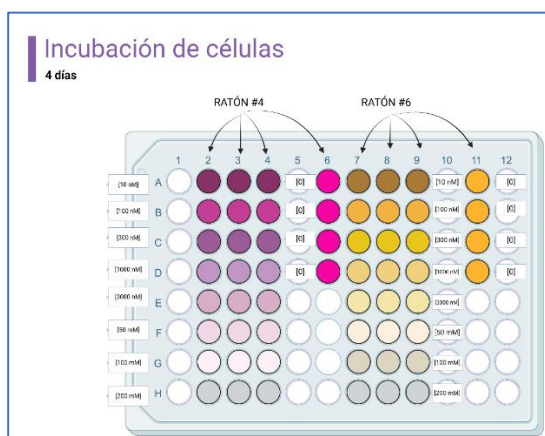
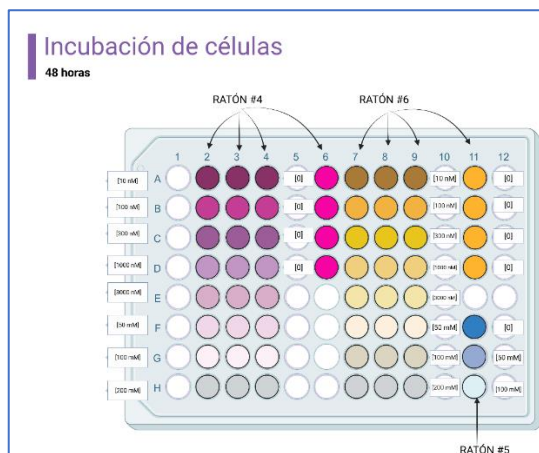
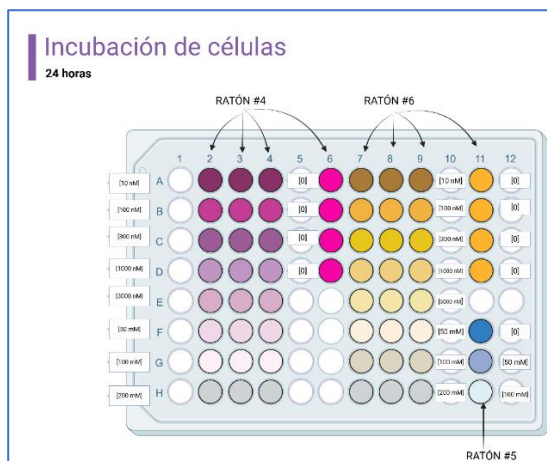
Número de ratón	μL de muestra
1	32.7
2	61.61
3	34.78
4	49.91
5	92.30
6	50

La distribución de las células para incubar fue de la siguiente manera:

Primera ronda



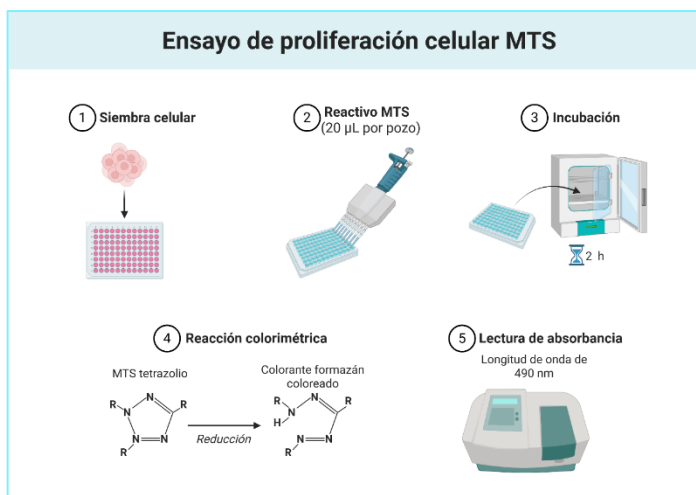
Segunda ronda



6.5 Análisis de datos

Terminado el periodo de incubación respectivo de cada placa, en la campana de flujo laminar con la luz directa apagada, se le agregaron 20 μ L de MTS a cada pozo, con una micropipeta sin tocar el medio. La placa se envolvió completamente en papel aluminio y se regresó a la incubadora durante 2 horas.

Posteriormente, la placa se colocó en un lector de microplacas para medir la absorbancia a una longitud de 490 nm.

Diagrama ensayo MTS

7. Resultados

7.1 Aislamiento de células mononucleares

Una de las características principales del aislamiento y cultivo de linfocitos siguiendo las sugerencias de Chaves et al., 2018 (método 2), es el uso de la solución ACK, la cual lisa los glóbulos rojos, mientras que deja intactas a las células mononucleares (leucocitos). En la Figura 6 se muestra el efecto de esta solución.

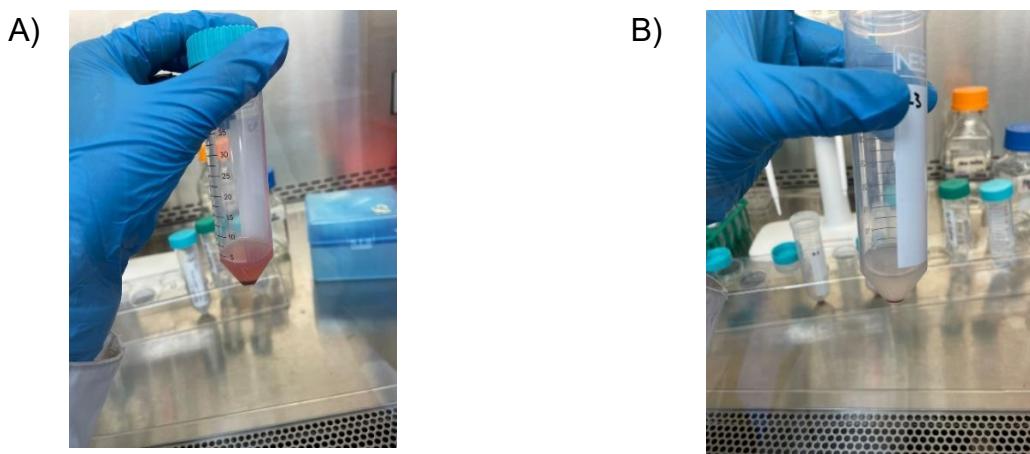


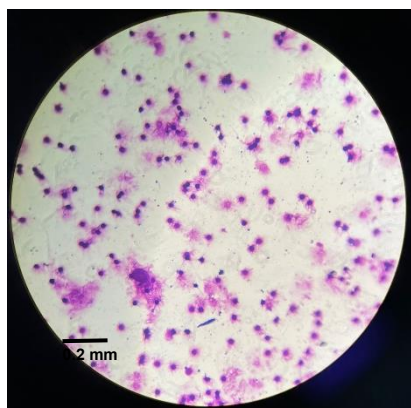
Figura 6. Uso de solución ACK. A) Muestra antes de usar ACK Lysing Buffer. Se observan a simple vista abundantes eritrocitos e incluso una muestra de un color de un poco más turbia. B) Muestra después de usar ACK Lysing Buffer. Se evidencia la eliminación de eritrocitos.

7.2 Frotis y Tinción de Wright de células mononucleares

El frotis y la tinción de Wright permite diferenciar los distintos tipos de células sanguíneas. Cuando esta tinción se realiza en muestras sin solución ACK se observan abundantes eritrocitos, mientras que al usar la solución ACK disminuye considerablemente el número de eritrocitos (Figura 7).

En la Figura 7 se muestra un frotis pre y post ACK Lysing Buffer. En el inciso A se observan abundantes eritrocitos que dificultan la visualización de las células mononucleares, mientras que en el inciso B se aprecia la eliminación efectiva de eritrocitos, permitiendo una observación más clara de los linfocitos y otras células mononucleares (monocitos en su mayoría).

A)



B)

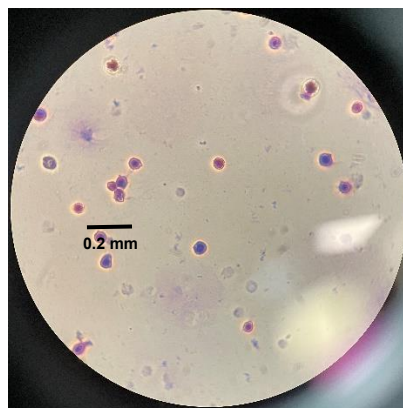


Figura 7. Tinción de Wright. A) Frotis pre-ACK. Se observan abundantes eritrocitos (células rosáceas). B) Frotis post-ACK se observa una disminución en el número de eritrocitos (células rosáceas) y células mononucleares con mayor claridad (células moradas). Las fotografías fueron tomadas con un Iphone 12 Pro con una cámara de 12 MP en un objetivo 10x y 100x en un microscopio compuesto marca Leica, modelo DM 1000.

7.3 Cultivos de células mononucleares

Los cultivos de las células aisladas se realizaron en periodos de 24 h, 48 h, 4 y 7 días en placas de 96 pozos. En la Figura 8, se muestra un cultivo de 48 h bajo microscopio compuesto Marca Leica, modelo DM IL LED con un aumento de objetivos de 10x y 100x. Se observa una alta densidad celular y diversidad

morfológica típica del aislamiento de células mononucleares.

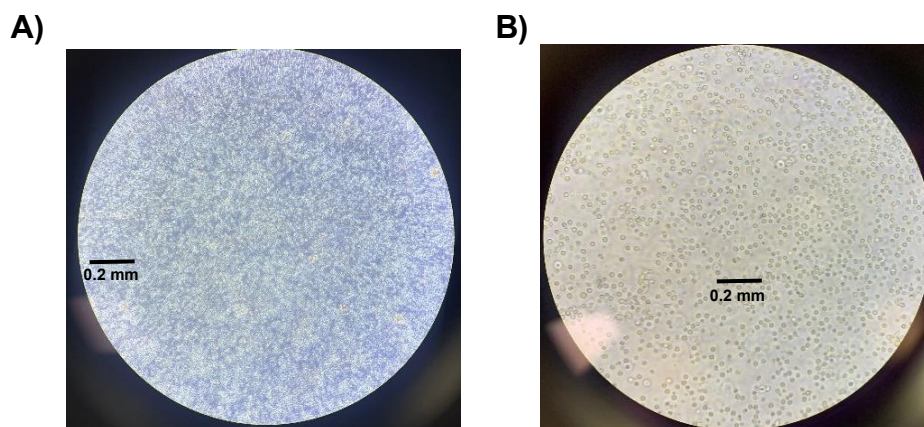


Figura 8. Células mononucleares obtenidas con Método 2 y cultivadas por 48 horas. A) Fotografía con objetivo 10X. B) Fotografía con objetivo 100X. En ambas imágenes se observan células consistentes con lo esperado de células mononucleares. Las fotografías fueron tomadas con un Iphone 12 Pro con una cámara de 12 MP en un microscopio compuesto Marca Leica modelo DM IL LED.

7.4 Conteo de células: Tinción azul tripán y cámara de Neubauer

La tinción de Azul Tripán y la cámara de Neubauer nos permitió contar el total de las células y distinguir por su coloración a las células viables (transparentes) de aquellas no viables (coloreadas de azul) (Figura 9).

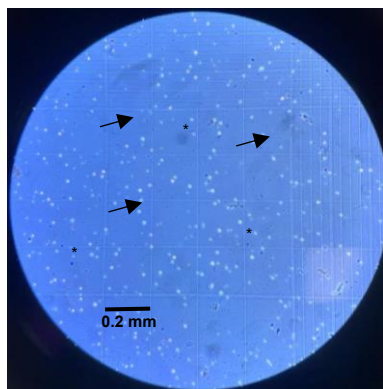


Figura 9. Fotografía de células cultivadas por 2 horas y teñidas con azul tripán. Con flechas se muestran ejemplos de células contabilizadas como viables por su coloración transparente y con asteriscos ejemplos de células contabilizadas como no viables por su coloración azul. Las fotografías fueron tomadas con un Iphone 12 Pro con una cámara de 12 MP bajo un microscopio compuesto marca Leica.

A)

Protocolo	millones de células	% de viabilidad
1	1-1.5	50%
2	38.8	78%
3	4.74	97%

B)

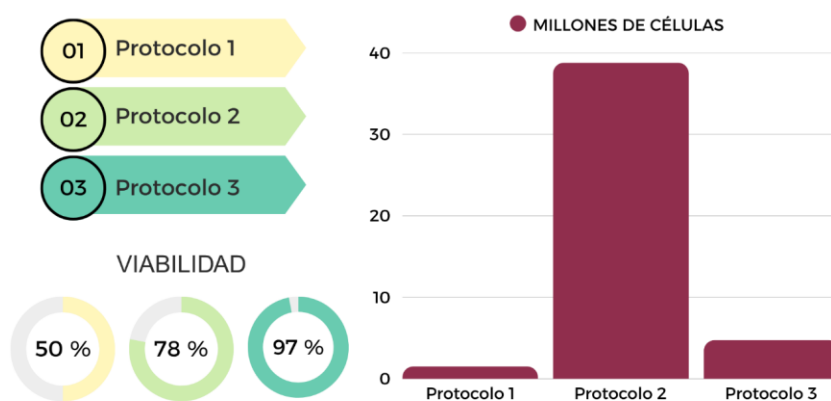


Figura 10. Viabilidad y número de células obtenidas. En A) se muestra la tabla de los valores obtenidos del número de células y del % de viabilidad celular de acuerdo con cada uno de los tres Métodos evaluados. En B) se muestra el porcentaje de viabilidad celular, con el método 3 se obtuvo mayor viabilidad celular (97 %) y el gráfico del número de células obtenidas, con el Método 2 se obtuvo el mayor número de células (38.8 millones).

Al realizar el aislamiento y cultivo de linfocitos con las tres técnicas obtuvimos que con el Método 1 (Sugerido por la Dra. González) se obtuvieron aproximadamente 1 millón de células con un 50 % de viabilidad (Viabilidad baja). Con el Método 2 (Tomado de Chaves et al., 2018) se obtuvieron aproximadamente 39 millones de células con el 78% de viabilidad (viabilidad normal). Con el Método 3 (Técnica de Ficoll) se obtuvieron aproximadamente 5 millones de células con el 97% de viabilidad (viabilidad excelente). Con respecto al número de células y la viabilidad, entre los 3 métodos, encontramos que el Método 2 ofrece estadísticamente mayor número de células, mientras que el Método 3 ofrece estadísticamente mayor viabilidad (Figura 10). Por lo anterior en los siguientes experimentos solo utilizamos el Método 2 (Tomado de Chaves et al., 2018), para hacer el resto de los experimentos.

7.5 Expansión clonal de linfocitos aislados y cultivados con Histamina

En condiciones control se obtuvieron 21 mediciones del día1, 17 mediciones del día2, 12 mediciones del día 4 y 12 mediciones del día 7. Los valores promedio y el error estándar de la DO obtenido para cada uno de los días se muestran en la tabla e imagen a continuación (Figura 12):

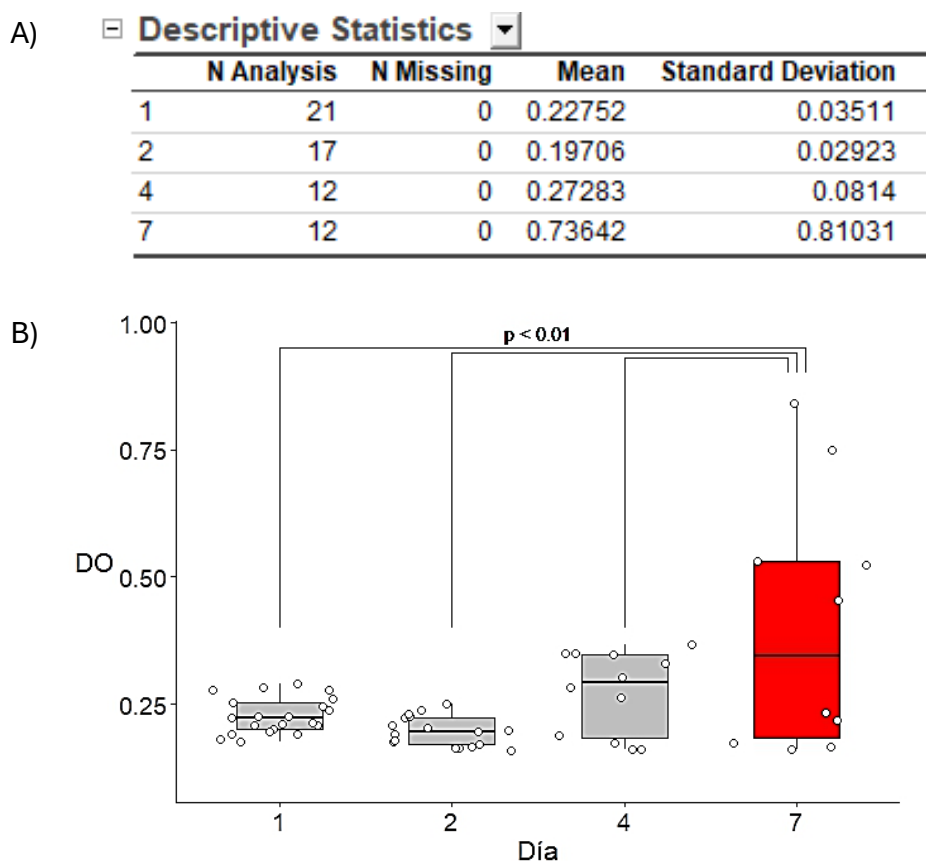


Figura 12. En A) se muestra la estadística descriptiva de las mediciones obtenidas en cada uno de los días evaluados. En B) se muestra un gráfico de cajas y bigotes (boxplot) de las mediciones obtenidas de DO para cada uno de los días, en puntos blancos se muestra cada una de las mediciones independientes, en el día 7 hay dos valores que quedan fuera de la gráfica mostrada. Los valores de DO para el 7mo día muestran una diferencia significativa con respecto al resto de los días.

Al evaluar si existía una diferencia en la medición de DO con respecto a los días, obtuvimos que, si existe dicha diferencia, con un valor de $p=0.0005$. El análisis posthoc con la prueba de Tukey, mostro que existe diferencia significativa entre el día 7 y los días 1,2, y 4.

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	2.5415	0.84717	6.6999	5.84294E-4
Error	58	7.33378	0.12644		
Total	61	9.87528			

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
2 1	-0.03046	0.11601	0.37137	0.99359	0.05	0
4 1	0.04531	0.12868	0.49796	0.98487	0.05	0
4 2	0.07577	0.13407	0.79929	0.94198	0.05	0
7 1	0.50889	0.12868	5.59287	0.00118	0.05	1
7 2	0.53936	0.13407	5.68929	9.45665E-4	0.05	1
7 4	0.46358	0.14517	4.51615	0.01186	0.05	1

Grouping Letters Table

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0.05 level.
Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0.05 level.

Debido a que esta evaluación fue hecha en cultivos celulares en condiciones control, es decir, sin ningún fármaco adicional, podemos concluir que a partir del 4to día las células mononucleares comenzaron a aumentar.

7.6 Aplicación de Histamina durante 1, 2 y 4 días

Para determinar el efecto de histamina sobre los linfocitos de manera aguda y a mediano plazo, aplicamos histamina a las concentraciones 10 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ MA, durante 1 día, 2 días y 4 días. Al realizar la prueba ANOVA para evaluar el efecto de la histamina, encontramos que en ninguno de los días hubo efecto estadísticamente significativo, el valor de “p” para el día 1 fue 0.74, el valor de “p” para el día 2 fue 0.67 mientras que el valor de “p” para el día 4 fue 0.38. Esto muestra que la incubación con histamina por si sola a corto

plazo no afecta la cantidad de linfocitos. Los análisis estadísticos y el gráfico correspondiente a de cada uno de los días se muestra en las figuras (13, 14, 15).

A) ☐ Descriptive Statistics ☐

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
0	21	0	0.22752	0.03511	0.00766
0.01	6	0	0.22783	0.04273	0.01744
0.1	6	0	0.23867	0.05771	0.02356
0.3	6	0	0.23617	0.06255	0.02553
1	6	0	0.23383	0.0502	0.02049
3	6	0	0.236	0.06139	0.02506
50	16	0	0.25081	0.03435	0.00859
100	16	0	0.25125	0.0404	0.0101
200	16	0	0.24694	0.03652	0.00913

B) ☐ ANOVA ☐

☐ Overall ANOVA ☐

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	8	0.00923	0.00115	0.63468	0.74664
Error	90	0.16364	0.00182		
Total	98	0.17287			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are not significantly different.

C)

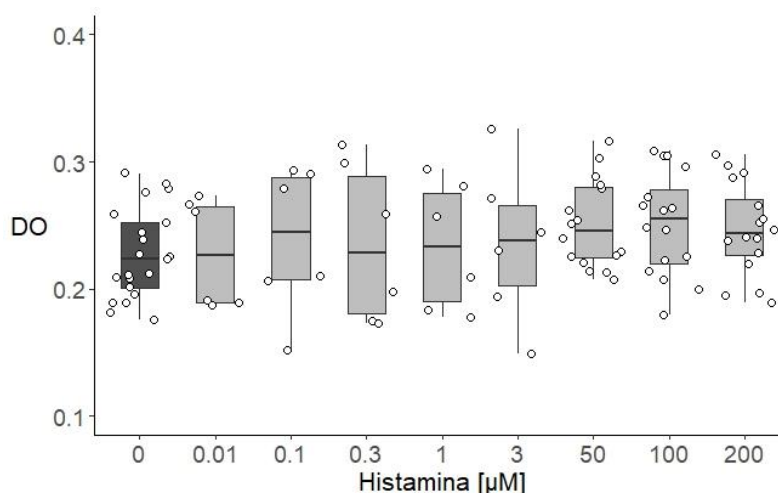


Figura 13. Aplicación de Histamina durante 24 h. En **A)** se muestra la estadística descriptiva de las mediciones obtenidas de DO en condiciones control y con aplicación de Histamina a las concentraciones μM indicadas. En **B)** Se muestra el valor de la prueba ANOVA, no hubo diferencia significativa ($p=0.74$). En **C)** se

muestra un gráfico de cajas y bigotes (boxplot) de la DO para cada concentración, los puntos blancos representan las mediciones independientes.

A) ☐ Descriptive Statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
0	17	0	0.19706	0.02923	0.00709
0.01	6	0	0.23233	0.07034	0.02872
0.1	6	0	0.219	0.05989	0.02445
0.3	6	0	0.21967	0.05113	0.02087
1	6	0	0.2275	0.08003	0.03267
3	6	0	0.23067	0.08092	0.03303
50	15	0	0.21733	0.04049	0.01046
100	15	0	0.2208	0.03132	0.00809
200	15	0	0.2312	0.03143	0.00811

B) ☐ ANOVA

☐ Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	8	0.01282	0.0016	0.72037	0.67298
Error	83	0.18468	0.00223		
Total	91	0.19751			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.
 At the 0.05 level, the population means are not significantly different.

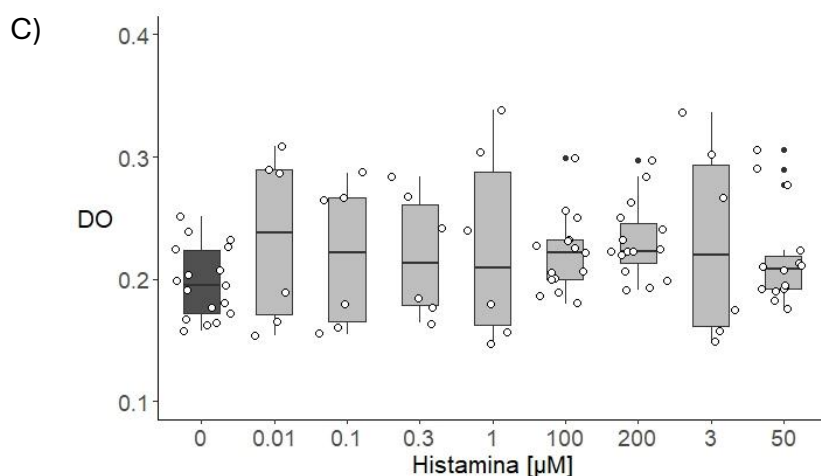


Figura 14. Aplicación de Histamina durante 48 h. En A) se muestra la estadística descriptiva de las mediciones obtenidas de DO en condiciones control y con aplicación de Histamina a las concentraciones μM indicadas. En B) Se muestra el valor de la prueba ANOVA, no

hubo diferencia significativa ($p=0.67$). En C) se muestra un gráfico de cajas y bigotes (boxplot) de la DO para cada concentración, los puntos blancos representan las mediciones independientes.

A) ☐ Descriptive Statistics ☐

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
0	12	0	0.27283	0.0814	0.0235
0.01	6	0	0.29417	0.04487	0.01832
0.1	6	0	0.29817	0.07839	0.032
0.3	6	0	0.251	0.07715	0.0315
1	6	0	0.28033	0.0751	0.03066
3	6	0	0.23217	0.04261	0.0174
50	10	0	0.3035	0.03973	0.01256
100	10	0	0.2872	0.04294	0.01358
200	10	0	0.3007	0.0515	0.01628

B) ☐ ANOVA ☐

☐ Overall ANOVA ☐

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	8	0.03253	0.00407	1.0884	0.38302
Error	63	0.23538	0.00374		
Total	71	0.26792			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are not significantly different.

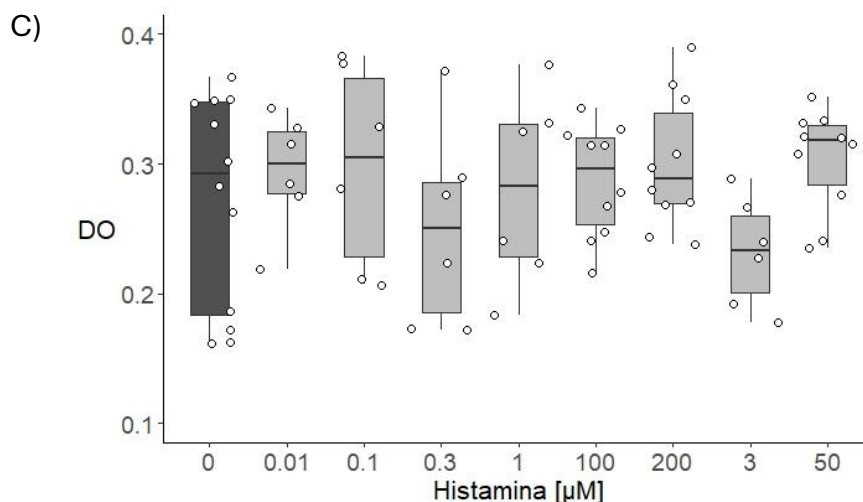


Figura 15. Aplicación de Histamina durante 4 días. En A) se muestra la estadística descriptiva de las mediciones obtenidas de DO en condiciones control y con aplicación de Histamina a las concentraciones μM indicadas. En B) Se muestra el valor de la prueba ANOVA, no hubo diferencia significativa ($p=0.38$). En C) se muestra un gráfico de

cajas y bigotes (boxplot) de la DO para cada concentración, los puntos blancos representan las mediciones independientes.

7.7 Aplicación de Histamina durante 7 días

Para determinar el efecto de histamina sobre los linfocitos a mediano y largo plazo, aplicamos histamina a las concentraciones 10 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M, durante 7 días. Al realizar la prueba ANOVA para evaluar el efecto de la histamina, encontramos que si hubo un aumento en la lectura de DO estadísticamente significativo con un valor de $p=0.04$. Al realizar la prueba Holm-Sidak, que es un método de corrección para comparaciones múltiples, encontramos que las concentraciones de 50 μ M y 200 μ M son las que mostraron un efecto significativo con respecto a las demás. No pudimos realizar un ajuste dosis efecto a nuestros datos debido a que nuestros resultados no tienen un ajuste logístico. Este resultado muestra que la incubación con histamina por si sola a corto largo plazo si promueve el aumento de la cantidad de linfocitos. Los análisis estadísticos y el gráfico correspondiente se muestran a continuación en la figura (16), la tabla de comparaciones Holm-Sidak se muestra en la Figura (17).

A) ☐ Descriptive Statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
0	12	0	0.73692	0.81138	0.23423
0.01	6	0	0.28067	0.05942	0.02426
0.1	6	0	0.26117	0.07871	0.03213
0.3	6	0	0.233	0.06184	0.02525
1	6	0	0.245	0.05344	0.02182
3	6	0	0.2265	0.02158	0.00881
50	10	0	0.9425	0.84444	0.26703
100	10	0	0.8063	0.84091	0.26592
200	10	0	1.007	0.85599	0.27069

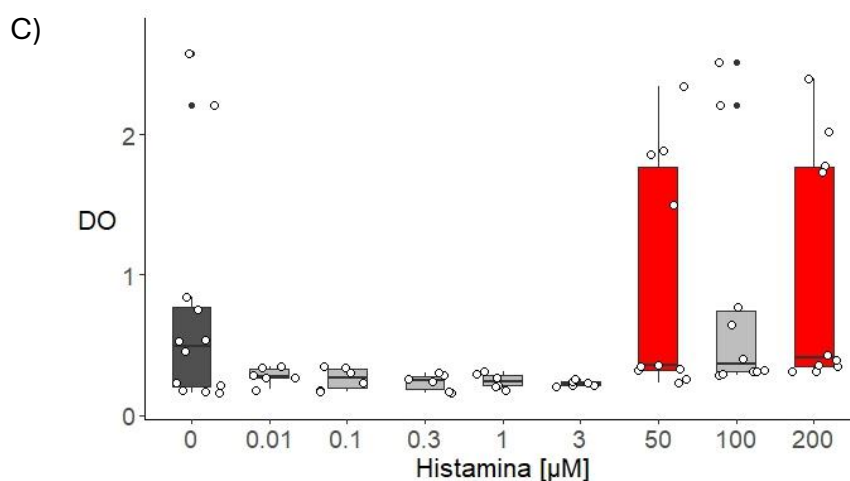
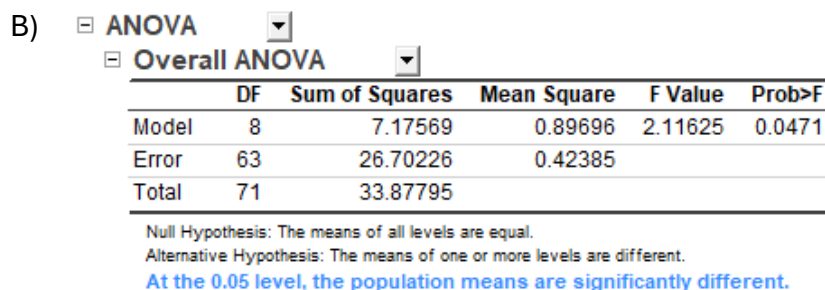


Figura 16. Aplicación de Histamina durante 7 días En A) se muestra la **estadística descriptiva** de las mediciones obtenidas de DO en condiciones control y con aplicación de Histamina a las concentraciones μM indicadas. En B) Se muestra el valor de la prueba ANOVA, a los 7 días si hubo un aumento significativo de la DO ($p=0.04$). En C) se muestra un **gráfico de cajas y bigotes (boxplot)** de la DO para cada **concentración**, en las concentraciones de 50 μM y 200 μM hubo un aumento en el número de linfocitos con respecto al control y con respecto al resto de los grupos.

Sidakholm Test ▼						
	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig
200 3	0.7805	0.33619	2.32159	0.0235	0.00142	0
200 0.3	0.774	0.33619	2.30225	0.02464	0.00146	0
200 1	0.762	0.33619	2.26656	0.02686	0.00151	0
200 0.1	0.74583	0.33619	2.21847	0.03013	0.00155	0
200 0.01	0.72633	0.33619	2.16047	0.03455	0.0016	0
50 3	0.716	0.33619	2.12973	0.03711	0.00165	0
50 0.3	0.7095	0.33619	2.1104	0.0388	0.00171	0
50 1	0.6975	0.33619	2.0747	0.0421	0.00177	0
50 0.1	0.68133	0.33619	2.02662	0.04694	0.00183	0
50 0.01	0.66183	0.33619	1.96861	0.0534	0.0019	0
100 3	0.5798	0.33619	1.72461	0.0895	0.00197	0
100 0.3	0.5733	0.33619	1.70527	0.09307	0.00205	0
100 1	0.5613	0.33619	1.66958	0.09996	0.00213	0
100 0.1	0.54513	0.33619	1.62149	0.10991	0.00223	0
3 0	-0.51042	0.32552	-1.56802	0.12189	0.00233	0
100 0.01	0.52563	0.33619	1.56349	0.12295	0.00244	0
0.3 0	-0.50392	0.32552	-1.54805	0.12662	0.00256	0
1 0	-0.49192	0.32552	-1.51119	0.13574	0.0027	0
0.1 0	-0.47575	0.32552	-1.46152	0.14884	0.00285	0
0.01 0	-0.45625	0.32552	-1.40162	0.16594	0.00301	0
200 0	0.27008	0.27876	0.96889	0.33631	0.0032	0
50 0	0.20558	0.27876	0.7375	0.46355	0.00341	0
200 100	0.2007	0.29115	0.68933	0.49315	0.00366	0
100 50	-0.1362	0.29115	-0.4678	0.64154	0.00394	0
100 0	0.06938	0.27876	0.2489	0.80425	0.00427	0
200 50	0.0645	0.29115	0.22153	0.82539	0.00465	0
3 0.01	-0.05417	0.37587	-0.14411	0.88587	0.00512	0
0.3 0.01	-0.04767	0.37587	-0.12682	0.89949	0.00568	0
1 0.01	-0.03567	0.37587	-0.09489	0.9247	0.00639	0
3 0.1	-0.03467	0.37587	-0.09223	0.92681	0.0073	0
0.3 0.1	-0.02817	0.37587	-0.07494	0.9405	0.00851	0
0.1 0.01	-0.0195	0.37587	-0.05188	0.95879	0.01021	0
3 1	-0.0185	0.37587	-0.04922	0.9609	0.01274	0
1 0.1	-0.01617	0.37587	-0.04301	0.96583	0.01695	0
1 0.3	0.012	0.37587	0.03193	0.97463	0.02532	0
3 0.3	-0.0065	0.37587	-0.01729	0.98626	0.05	0

Figura 17. Tabla de comparaciones Holm-Sidak

8. Discusión

¿Por qué los linfocitos se expanden clonalmente al séptimo día?

Es importante señalar que la proliferación linfocitaria observada hasta el séptimo día no implica necesariamente la presencia de una estimulación antigénica continua. Diversos estudios han demostrado que una señal inicial suficiente – que incluya el reconocimiento antigénico y la coestimulación adecuada- es capaz de inducir un programa proliferativo autónomo que se mantiene durante varios días aún en ausencia del antígeno. Este fenómeno ha sido documentado tanto *in vitro* como *in vivo*, donde linfocitos estimulados transitoriamente continúan dividiéndose durante 5-7 días debido a la activación sostenida de vías proliferativas, la producción autocrina de citocinas como IL-2 y la expresión prolongada de su receptor de alta afinidad (CD25) (Gett & Hodgkin, 2000; Duthoo et al., 2022). En este contexto, la expansión clonal observada alrededor del día 7 refleja la ejecución de un programa celular previamente establecido más que una dependencia directa de señales antigénicas persistentes.

Además, el incremento en el número de linfocitos observado al séptimo día de cultivo, aún en ausencia de estimulación antigénica exógena, puede explicarse por mecanismos de proliferación homeostática y activación basal. Los linfocitos esplénicos primarios incluyen subpoblaciones de memoria y células previamente activadas *in vivo*, capaces de responder a citocinas de supervivencia como L-7 e IL-15, producidas de manera endógena por células acompañantes presentes en el cultivo (Surh & Sprent, 2008; Schluns & Lefrançois, 2003).

Adicionalmente, la señalización tónica del TCR mediada por interacciones de baja afinidad con MHC propio, junto con la selección de subpoblaciones metabólicamente más resistentes y la influencia acumulativa de factores presentes en el suero, pueden favorecer una expansión clonal tardía detectable alrededor del día 7 (Rathmell & Thompson, 2002; Michalek & Rathmell, 2010).

¿Por qué la histamina no afecta el crecimiento de linfocitos en los días 1,2 y 4?

La histamina no pareció afectar significativamente la proliferación de linfocitos en

los primeros días de las células cultivadas, en nuestro estudio (1,2 y 4). Esto puede deberse a la dinámica natural de la activación de linfocitos. Los linfocitos T experimentan una actividad proliferativa aumentada en las etapas iniciales, que es impulsada principalmente por la IL-2 e involucra la activación de varias vías de señalización como NF-kB, mTOR, Ca^{2+} -calcineurina, que son fuertemente inducidas en las primeras 48-96 horas después de la estimulación (Weiss, A., & Littman, D., 1994). Estas señales mitogénicas tempranas son lo suficientemente fuertes como para anular la influencia de moléculas externas, de modo que la acción inhibitoria de la histamina no puede detectarse en esta etapa. Además, la expresión de receptores de histamina en linfocitos, especialmente H2R y H4R, es baja en condiciones basales y aumenta gradualmente con la activación celular; es decir, su expresión aumenta tarde, no en las primeras 24-48 horas (Jutel et al., 2009).

La histamina no puede mostrar un efecto obvio si los receptores aún no están completamente expresados. Debido a la baja expresión inicial, la histamina no puede modular los procesos tempranos en el ciclo celular. Así que, aunque la histamina tiene una modalidad de efecto reguladora más que mitogénica dependiendo del receptor, puede: inhibir la producción de IL-2 (H2R), modular Th1/Th2, cambiar el metabolismo celular; pero no es un estímulo proliferativo primario. En los primeros días, donde la proliferación depende en gran medida de IL-2 y de señales coestimuladoras, el efecto de la histamina es pequeño no medible (Jutel et al., 2009; Boyman, O., & Sprent, J., 2012).

Y, por último, en estos primeros días, el cultivo aún muestra un microambiente óptimo: el contenido de glucosa, la cobertura de aminoácidos y el contenido de oxígeno son suficientes, los metabolitos inhibitorios no se han acumulado y la viabilidad celular es alta. Bajo estas condiciones, la proliferación se basa principalmente en señales de activación intrínsecas en lugar de la presencia de moduladores externos. Y la proliferación inicial depende de reservas celulares ya activadas. Los primeros ciclos de división (24 a 72 h) se caracterizan por: entrar en el ciclo celular a través de señales fuertes; clones ya en activación y en expansión automática. En este sentido, la capacidad proliferativa ya estaba programada y la histamina no pudo contrarrestar este paso inicial. Por lo tanto, la ausencia de un

efecto detectable de la histamina en los días 1,2 y 4 está de acuerdo con la fisiología normal de los linfocitos durante la expansión clonal temprana (Cornish et al., 2006).

¿Por qué la histamina sí afecta el crecimiento de linfocitos en el 7mo día?

A diferencia de los primeros días de cultivo, la histamina sí tuvo un efecto significativo en la proliferación de linfocitos en el día 7. Esto es consistente con la fisiología de los linfocitos en las fases tardías de la expansión clonal, durante las cuales la IL-2 disminuye, las vías de señalización proliferativa comienzan a declinar y los linfocitos se vuelven más susceptibles a señales inhibitorias externas (Dohlsten et al., 1987).

En cultivos prolongados, el cambio en el microambiente implica el agotamiento de nutrientes, la caída del pH, la acumulación de metabolitos, el estrés oxidativo y otros factores que promueven la activación de vías asociadas con la apoptosis o la inhibición del ciclo celular. Este entorno hace que cualquier modulador externo, como la histamina en este caso, sea capaz de alterar el equilibrio con una disminución en la proliferación, un aumento en la apoptosis y una disminución en la viabilidad (Michalek, R., & Rathmell, J., 2010; Zeng et al., 2025). En este contexto metabólicamente vulnerable, la histamina puede ejercer un efecto más evidente a través de sus receptores H2R y H4R, cuya expresión aumenta conforme avanza la activación linfocitaria (Jutel et al., 2009). La activación de H2R ha sido asociada con la elevación de AMPc y la inhibición de la producción de IL-2, menor proliferación y respuesta Th1; mientras que H4R modula migración, quimiotaxis e incluso apoptosis (Rezai et al., 1990; Zampeli, E., & Tiligada, E., 2009).

Los linfocitos no son igualmente sensibles a la histamina todos los días en cultivo. En el día 7 hay más receptores funcionando, por lo que la histamina puede tener un efecto más claro. Finalmente, notemos que estas células activadas ya no están en máxima expansión. La expansión clonal se ha maximizado (a los 7 días) y ya está entrando en una fase de declive natural. En este punto, incluso pequeñas modulaciones tienen un impacto detectable. La histamina no compite contra señales proliferativas fuertes (porque ya han ocurrido) sino contra un sistema que se autolimita.

9. *Conclusión*

En base a los resultados obtenidos en este estudio podemos sugerir que El impacto de la histamina sobre la proliferación de los linfocitos depende tanto del tiempo de exposición como del estado de activación celular. Dicho efecto es limitado durante las fases tempranas de activación, pero se vuelve más evidente durante la fase tardía de crecimiento clonal. En conjunto, estos resultados aportan evidencia sobre el papel inmunomodulador de la histamina y destacan la importancia crítica de la cinética de activación de los linfocitos al evaluar los efectos de mediadores químicos en la respuesta inmune adaptativa.

10. Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., y Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular* (8ªed.). Elsevier
- Abbas, K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2018). *Células y tejidos del sistema inmunitario. Inmunología celular y molecular. (9 ed.)* Elsevier.
- Aldossari, A. A., Assiri, M. A., Ansari, M. A., Nadeem, A., Attia, S. M., Bakheet, S. A., Albekairi, T. H., Alomar, H. A., Al-Mazroua, H. A., Almanaa, T. N., Al-Hamamah, M. A., Alwetaid, M. Y., & Ahmad, S. F. (2023). Histamine H4 Receptor Antagonist Ameliorates the Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Regulation of T-Cell Imbalance. *International journal of molecular sciences*, 24(20), 15273. <https://doi.org/10.3390/ijms242015273>
- Akdis, C. A., & Blaser, K. (2003). Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 112(1), 15–22. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1585>
- Ali, F. M., May, A., McLaren, G. D., & Jacobs, A. (1982). A two-step procedure for obtaining normal peripheral blood T-lymphocytes using continuous equilibrium density gradient centrifugation on percoll. *Journal of immunological methods*, 49(2), 185–191. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(82\)90276-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(82)90276-9)
- Barrett K.E., Barman S.M., Brooks H.L., y Yuan J.J.,(2020). Inmunidad, infección e inflamación. *Ganong Fisiología médica, 26a.* McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=2954§ionid=248864416>
- Bernheim, J. L., Dorian, R. E., & Mendelsohn, J. (1978). DNA synthesis and proliferation of human lymphocytes *in vitro*. I. Cell kinetics of response to phytohemagglutinin. *Journal of Immunology*, 120(3), 955–962.
- Blum, K. S., y Pabst, R. (2007). Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs?. *Immunology letters*, 108(1),

- 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.10.009>
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 180–190. <https://doi.org/10.1038/nri3156>
 - Böyum A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, 97, 77–89. PMID: 4179068
 - Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006; 34(5):455-65. DOI: 10.1080/01926230600867743. PMID: 17067939.
 - Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M., y Vidal-Carou, M. D. C. (2020). Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*, 10(8), 1181. <https://doi.org/10.3390/biom10081181>
 - Cornish, G. H., Sinclair, L. V., & Cantrell, D. A. (2006). Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood*, 108(2), 600–608. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4827>
 - Del Rio, R., Noubade, R., Saligrama, N., Wall, E. H., Krementsov, D. N., Poynter, M. E., Zachary, J. F., Thurmond, R. L., & Teuscher, C. (2012). Histamine H4 receptor optimizes T regulatory cell frequency and facilitates anti-inflammatory responses within the central nervous system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(2), 541–547. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101498>
 - Dohlsten, M., Sjögren, H. O., & Carlsson, R. (1987). Histamine acts directly on human T cells to inhibit interleukin-2 and interferon-gamma production. *Cellular Immunology*, 109(1), 65–74. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(87\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0008-8749(87)90292-9)
 - Duthoo, E., Vral, A., & Baeyens, A. (2022). An updated view into the cell cycle kinetics of human T lymphocytes and the impact of irradiation. *Scientific*

- Reports*, 12(1), Article 7687. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11364-9>
- Ferstl, R., Akdis, C. A. & O'Mahony, L. (2012). Histamine regulation of innate and adaptative immunity. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 17(1), 40-53. DOI: [10.2741/3914](https://doi.org/10.2741/3914)
 - Fox S., (2023). *Sistema inmunitario. Fisiología humana, 15e*. McGraw Hill Education. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=3384§ionid=281683388>
 - Francis, H., DeMorrow, S., Franchitto, A., Venter, J., Mancinelli, R., White, M., ... Alpini, G. (2012). Histamine stimulates the proliferation of small and large cholangiocytes by activation of both IP3/Ca²⁺ and cAMP-dependent signaling mechanisms. *Laboratory Investigation*, 92(2), 282–294. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.158>
 - Fukasawa, T., Yoshizaki-Ogawa, A., Enomoto, A., Miyagawa, K., Sato, S., & Yoshizaki, A. (2022). Pharmacotherapy of Itch-Antihistamines and Histamine Receptors as G Protein-Coupled Receptors. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6579. <https://doi.org/10.3390/ijms23126579>
 - Fung, M. M., Rohwer, F., & McGuire, K. L. (2003). IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells. *Cellular Signalling*, 15(6), 625–636. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00003-2)
 - Gett, A. V., & Hodgkin, P. D. (2000). A cellular calculus for signal integration by T cells. *Nature Immunology*, 1(3), 239–244. <https://doi.org/10.1038/79782>
 - Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology: The immune system in health and disease* (5th ed.). Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>
 - Jutel, M., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2009). Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(12), 1786–1800. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03374.x>
 - Kaech, S. M., & Ahmed, R. (2001). Memory CD8⁺ T cell differentiation: Initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nature*

- Immunology*, 2(5), 415–422. <https://doi.org/10.1038/87720>
- Kaplan, M. H., Daniel, C., Schindler, U., & Grusby, M. J. (1998). Stat proteins control lymphocyte proliferation by regulating p27^{Kip1} expression. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), 1996–2003. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.4.1996>
 - Katzung B.G. y Vanderah T.W. (2024). Histamina, serotonina, fármacos contra la obesidad y alcaloides del cornezuelo de centeno. *Farmacología básica y clínica*, 16e. McGraw Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3445§ionid=285671062>
 - Lewis, S. M., Williams, A., & Eisenbarth, S. C. (2019). Structure and function of the immune system in the spleen. *Science immunology*, 4(33), eaau6085. DOI: [10.1126/sciimmunol.aau6085](https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085)
 - Lieberman, P. (2011). The basics of histamine biology. *Annals of allergy, asthma & immunology: oficial publication of the American College of Allergy Asthma & immunology*, 106(2 Suppl), S2-S5. DOI: [10.1016/j.anai.2010.08.005](https://doi.org/10.1016/j.anai.2010.08.005)
 - Matthyssens, G. E., Hurwitz, E., Givol, D., & Sela, M. (1975). Binding of histamine- and other ligand conjugated macromolecules to lymphocytes. *Molecular and celular biochemistry*, 7(2), 119-126. DOI: [10.1007/BF01792078](https://doi.org/10.1007/BF01792078)
 - Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2010). The metabolic life and times of a T-cell. *Immunological Reviews*, 236, 190–202. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00911.x>
 - Moriguchi, T., & Takai, J. (2020). Histamine and histidine decarboxylase: Immunomodulatory functions and regulatory mechanisms. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 25(7), 443–449. <https://doi.org/10.1111/gtc.12774>
 - Musio, S., Gallo, B., Scabeni, S., Lapilla, M., Poliani, P. L., Matarese, G., Ohtsu, H., Galli, S. J., Mantegazza, R., Steinman, L., & Pedotti, R. (2006). A Key Regulatory Role for Histamine in Experimental Autoimmune

- Encephalomyelitis: Disease Exacerbation in Histidine Decarboxylase-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 176(1), 17–26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.17>
- Özdemir, Ö., Kasımoğlu, G., Bak, A., Sütlüoğlu, H., & Savaşan, S. (2024). Mast cell activation syndrome: An up-to-date review of literature. *World journal of clinical pediatrics*, 13(2), 92813. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v13.i2.92813>
 - Paniagua R., Nistal M., Sesma P., Álvarez-Uría M., Fraile B., Anadón R., y Saéz F., (2017). Base celular de la respuesta inmunitaria. *Biología celular y molecular*, 4e. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=2214§ionid=171772633>
 - Rathmell, J. C., & Thompson, C. B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, 109(Suppl.), S97–S107. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00704-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00704-3)
 - Rezai, A. R., Salazar-Gonzalez, J. F., Martínez-Maza, O., Bramhall, J., Afrasiabi, R., & Kermani-Arab, V. (1990). Histamine blocks interleukin-2 gene expression and regulates IL-2 receptor expression. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 12(3), 345–362. <https://doi.org/10.3109/08923979009006468>
 - Rohana P., Fernández-Tresguerres J.A., Ruiz C., Cachofeiro V., Cardinali D.P., Escriche E., Gil-Loyzaga P.E., Juliá V., Teruel F., Pardo M. y Menéndez J. (2016). Bases celulares y moleculares del sistema inmunitario. *Fisiología humana*, 4e. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1858§ionid=134364757>
 - Ruiz-Sánchez, Bibiana Patricia, Cruz-Zárate, David, Estrada-García, Iris, & Wong-Baeza, Isabel. (2017). Las células linfoides innatas y su papel en la regulación de la respuesta inmune. *Revista alergia México*, 64(3), 347-363. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i3.284>

- Schluns, K. S., & Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 269–279. <https://doi.org/10.1038/nri1052>
- Surh, C. D., & Sprent, J. (2008). Homeostasis of naïve and memory T cells. *Immunity*, 29(6), 848–862. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.002>
- Thangam, E. B., Jemima, E. A., Singh, H., aig, M. S., Khan, M., Mathias, C. B., Church, M. K., & Saluja, R. (2018). The Role of histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Frontiers in immunology*, 9, 1873. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01873>
- Valent, P., Akin, C., Arock, M., Brockow, K., Butterfield, J. H., Carter, M. C., Castells, M., Escribano, L., Hartmann, K., Lieberman, P., Nedoszytko, B., Orfao, A., Schwartz, L. B., Sotlar, K., Sperr, W. R., Triggiani, M., Valenta, R., Horny, H. P., & Metcalfe, D. D. (2012). Definitions, criteria and global classification of mast cell disorders with special reference to mast cell activation syndromes: a consensus proposal. *International archives of allergy and immunology*, 157(3), 215–225. <https://doi.org/10.1159/000328760>
- Weiss, A., & Littman, D. R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, 76(2), 263–274. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90334-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90334-4)
- Zampeli, E., & Tiligada, E. (2009). The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *British Journal of Pharmacology*, 157(1), 24–33. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00151.x>
- Zeng, W. P., Yang, S., & Zhou, B. (2025). Intracellular pH links energy metabolism to lymphocyte death and proliferation. *Scientific Reports*, 15(1), Article 32878. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-16862-0>
- Zhao, Y., Zhang, X., Jin, H., Chen, L., Ji, J., & Zhang, Z. (2022). Histamine Intolerance-A Kind of Pseudoallergic Reaction. *Biomolecules*, 12(3), 454. <https://doi.org/10.3390/biom12030454>