



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
FARMACOBIOLOGÍCAS



TÍTULO DE LA TESIS

**Evaluación de inhibidores farmacológicos de GPR15
mediante ensayos *in vitro***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGÍCAS

PRESENTA

Rangel Yamili Anahí

CODIRECCIÓN:

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Dr. Julio Enrique Castañeda Delgado

San Luis Potosí, SLP., México, a 8 de agosto de 2023.

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este trabajo de tesis está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

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

Créditos institucionales

Este proyecto se realizó en la Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el periodo comprendido entre el 1 de julio de 2022 al 1 de julio de 2023, bajo la dirección del Dr. Julio Enrique Castañeda Delgado y la Dra. Diana Patricia Portales Pérez y fue apoyado por el proyecto Pan American League of Associations of Rheumatology (PANLAR) de GPR15.

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCyT, con número de registro 003382. Número de registro de la beca otorgada por CONAHCyT CVU: 1144220.

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma "turnitin" (<https://www.turnitin.com/es>). El informe de originalidad reportó un 17% de similitud.

Evaluación de inhibidores farmacológicos de GPR15 mediante ensayos in vitro

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

ÍNDICE DE SIMILITUD



Evaluación de inhibidores farmacológicos de GPR15 mediante ensayos in vitro por Yamili Anahí Rangel se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
FARMACOBIOLOGÍAS



TÍTULO DE LA TESIS

**Evaluación de inhibidores farmacológicos de GPR15
mediante ensayos *in vitro***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGÍAS

PRESENTA

Rangel Yamili Anahí

SINODALES:

Dr. Sergio Zarazúa Guzmán
Presidente del jurado

Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Secretaria

Dr. Julio Enrique Castañeda Delgado
Vocal

Dra. Martha Edith Macías Pérez
Vocal

San Luis Potosí, SLP., México, a 8 de agosto de 2023.

San Luis Potosí, SLP.

14 de julio de 2023.

Comité Académico del Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

Facultad de Ciencias Químicas-UASLP

P R E S E N T E

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de maestría la Q.F.B. Yamili Anahí Rangel, titulada “Evaluación de inhibidores farmacológicos de GPR15 mediante ensayos *in vitro*” ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para iniciar los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 8 de agosto de 2023 a las 10:00 hrs. en el Auditorio Chico (G203) de la facultad.

ATENTAMENTE

Dr. Julio Enrique Castañeda Delgado

Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas-IMSS

Co-director de tesis

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Laboratorio de Inmunobiología celular y molecular-UASLP

Co-directora de tesis

Dr. Sergio Zarazúa Guzmán

Laboratorio de Neurotoxicología-UASLP

Asesor

Dra. Martha Edith Macías Pérez

Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas-IMSS

Asesora externa

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Julio Castañeda** por brindarme la oportunidad de ser su estudiante de maestría y por el apoyo y confianza que puso en mí para la realización de este proyecto.

A mis asesores de San Luis Potosí, la **Dra. Diana Portales** y el **Dr. Sergio Zarazúa** por el seguimiento que dieron en mi formación y por estar al pendiente de las dudas que surgían a lo largo de la tesis experimental.

A mis compañeros de maestría **Moni Nambo, Moni Córdova y Omar** por hacer de las clases más divertidas y ligeras, por la ayuda mutua cuando nos juntábamos a estudiar para los exámenes y exposiciones.

A mis compañeros de laboratorio **José Luis, Sofi, Elsa, Kass, Liss y Ricardo** que contribuyeron a la realización de este proyecto, a sus conocimientos y colaboración para abordar desafíos técnicos que fueron fundamentales para obtener resultados significativos.

Y finalmente, pero no menos importante, a mi familia, a mi mamá **Luz María Rangel** por ser un pilar en mi crecimiento profesional y a mi pareja **Saúl** por apoyarme en otra tesis más y por no dejar de darme ánimos.

Con cariño, Yamili.

Evaluación de inhibidores farmacológicos de GPR15 mediante ensayos *in vitro*

Rangel YA^{1,2}, Macías-Pérez ME², Zarazúa-Guzmán S¹, Portales-Pérez DP¹ y
Castañeda-Delgado JE²

¹ Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

² Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, IMSS

RESUMEN

Las quimiocinas estimulan la quimiotaxis al unirse a sus receptores. GPR15/BOB es un receptor de quimiocinas implicado en enfermedades inflamatorias. Su ligando endógeno, GPR15L, es una quimiocina. Nuestro grupo identificó antagonistas de GPR15 por docking molecular y evaluamos su efecto sobre el bloqueo de este receptor. Evaluamos la vía de señalización de GPR15 analizando beta-arrestina-2 e influjos de calcio, y la migración celular. Loratadina y pranlukast muestran una tendencia a inhibir la migración y cromolín a aumentarla como lo hace el ligando endógeno de GPR15. No hubo diferencia en la abundancia de beta-arrestina-2 tras la estimulación con GPR15L. Loratadina y pranlukast estimulan la entrada de calcio a altas concentraciones. Loratadina y pranlukast podrían ser potenciales inhibidores del blanco terapéutico GPR15.

Palabras clave: Inflamación, quimiocinas, quimiotaxis, GPR15, GPR15L.

Evaluation of pharmacological inhibitors of GPR15 by *in vitro*

assays

Rangel YA^{1,2}, Macías-Pérez ME², Zarazúa-Guzmán S¹, Portales-Pérez DP¹ y
Castañeda-Delgado JE²

¹ Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

² Unidad de Investigación Biomédica de Zacatecas, IMSS

ABSTRACT

Chemokines stimulate chemotaxis by binding to their receptors. GPR15/BOB is a chemokine receptor involved in inflammatory diseases. Its endogenous ligand, GPR15L, is a chemokine. Our group identified GPR15 antagonists by molecular docking and evaluated their effect on the blockade of this receptor. We evaluated the GPR15 signaling pathway by analyzing beta-arrestin-2 and calcium influxes, and cell migration. Loratadine and pranlukast show a tendency to inhibit migration and cromolyn to increase it, as does the endogenous ligand of GPR15. There was no difference in the abundance of beta-arrestin-2 after stimulation with GPR15L. Loratadine and pranlukast stimulate calcium entry at high concentrations. Loratadine and pranlukast could be potential inhibitors of the GPR15 therapeutic target.

Keywords: Inflammation, chemokines, chemotaxis, GPR15, GPR15L.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Respuesta inflamatoria.....	2
2.2 Quimiocinas como mediadores proinflamatorios.....	2
2.3 Receptores acoplados a proteínas G (GPCR)	3
2.4 Regulación de la señalización de los GPCR	4
2.5 El nuevo receptor de quimiocinas GPR15/BOB	5
2.6 El ligando endógeno de GPR15: GPR15L/ C10orf99.....	6
2.7 Vía de señalización de GPR15-GPR15L.....	6
2.8 Trabajo previo <i>in silico</i>	7
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. HIPÓTESIS	8
5. OBJETIVO GENERAL	8
6. OBJETIVOS PARTICULARES	8
7. MATERIAL Y MÉTODOS	9
7.1 Reactivos	9
7.2 Comité de bioética y recolección de material biológico	9
7.3 Western blot	10
7.4 Citometría de flujo	11
7.5 Ensayos de citotoxicidad.....	11
7.6 Tinción intracelular	11
7.7 Ensayos de migración en cámara de Transwell.....	12

7.8	Ensayos de flujos de calcio	13
7.9	Análisis estadístico.....	13
8.	RESULTADOS	14
8.1	GPR15 se expresa en PBMCs y en mayor abundancia en PMNs de sujetos sanos.	14
8.2	Loratadina, pranlukast y cromolín no muestran efecto citotóxico en PBMCs de sujetos sanos.	16
8.3	Loratadina y pranlukast inhiben la migración mediada por GPR15.....	18
8.4	La señalización de GPR15 por activación de GPR15L es independiente de β -arrestina 2.	20
8.5	Loratadina y pranlukast estimulan la entrada de calcio en PBMC.	22
9.	DISCUSIÓN.....	24
10.	CONCLUSIONES.....	28
11.	PERSPECTIVAS	28
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es un proceso complejo que se desencadena por patrones específicos que inducen el proceso inflamatorio, como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o asociados a daño (DAMPs) reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrón (PRR) en las células inmunes, así como por enfermedades autoinmunes, trastornos metabólicos y estrés oxidativo. El reclutamiento de leucocitos desde la sangre a los lugares de infección es una parte importante del proceso inflamatorio, pero una respuesta desregulada subyace al desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas.

GPR15 es un receptor de quimiocinas no convencional que está involucrado en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y esclerosis múltiple, además de otras patologías como colitis ulcerativa, dermatitis y es un factor de riesgo para el infarto agudo al miocardio. Se expresa principalmente en leucocitos como linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos T reguladores FOXP3⁺, en macrófagos CD68⁺ y CD14⁺ de tejido sinovial, entre otros. Su ligando endógeno se denomina GPR15L y es una quimiocina del tipo CC que se expresa en diversos epitelios como colon, cérvix y piel. GPR15 está acoplado a la proteína G α_i para la transducción de señales. Cuando es activado por GPR15L dirige la señalización de Ca²⁺, el reclutamiento de beta-arrestina y la migración *in vitro* de células transfectadas que expresan GPR15.

En este estudio se buscó caracterizar la vía de señalización de GPR15 en un modelo fisiológico y evaluar el efecto de loratadina, pranlukast y cromolín previamente identificados mediante docking molecular, como posibles inhibidores de GPR15 en la migración celular, el reclutamiento de beta-arrestina-2 y la señalización de Ca²⁺. Loratadina y pranlukast podrían ser los nuevos antagonistas del blanco terapéutico GPR15 al inhibir la migración, y esto lo hacen de manera dependiente de calcio e independiente de beta-arrestina-2.

2. ANTECEDENTES

2.1 Respuesta inflamatoria

La inflamación es una respuesta compleja e inespecífica de un tejido frente a una sustancia extraña o un daño. La respuesta inflamatoria comparte un mecanismo que se puede resumir de la siguiente manera: 1) reconocimiento a través de los PRR de los PAMPs o DAMPs; 2) activación de las vías de señalización de la inflamación; 3) liberación de mediadores inflamatorios; y 4) reclutamiento de células de la circulación (L. Chen et al., 2018).

La respuesta inflamatoria se desencadena por patógenos, células dañadas, compuestos tóxicos o irradiación. Tanto los agentes infecciosos como los no infecciosos y el daño tisular activan a las células residentes del tejido y desencadenan vías de señalización inflamatorias, más comúnmente las vías NF- κ B, MAPK y JAK-STAT que involucran la liberación de mediadores proinflamatorios como las citocinas o quimiocinas, las cuales culminan en la acumulación de leucocitos en las áreas de tejido afectadas (L. Chen et al., 2018; Medzhitov, 2010; Sugimoto, Vago, Perretti, & Teixeira, 2019).

En las enfermedades autoinmunes, donde no hay una infección o un daño al tejido, se dan por una pérdida de la autotolerancia inmunológica a los antígenos propios. Para mantener la homeostasis inmune en equilibrio, el individuo debe ser tolerante a sus propias sustancias potencialmente antigénicas; una vez que se interrumpe la autotolerancia, surgirá la autoinmunidad (Rodríguez-Castro et al., 2018). No se comprende del todo por qué se rompe esta autotolerancia, pero se ha descrito que el componente ambiental y elementos genómicos polimórficos, entre otros factores, desencadenan este desequilibrio (Eggenhuizen, Ng, & Ooi, 2020).

2.2 Quimiocinas como mediadores proinflamatorios

Durante los procesos inflamatorios agudos y crónicos, varios factores están involucrados en el reclutamiento de leucocitos. Dentro de estos mediadores

inflamatorios se encuentra un grupo de polipéptidos secretados conocidos como *quimiocinas* (citocinas quimiotácticas). Las quimiocinas son proteínas solubles con un tamaño molecular, de 8 a 10 kDa, que forman parte de la familia de citocinas y consisten en más de 50 moléculas. Son mejor conocidos por su capacidad para estimular la migración de las células, sobre todo de leucocitos (Jin, Xu, & Hereld, 2008). Las quimiocinas pueden ser *inflamatorias* u *homeostáticas*. Las primeras son producidas cuando un tejido libera citocinas inflamatorias y funcionan reclutando leucocitos. Las homeostáticas son expresadas constitutivamente y juegan un papel crucial en la migración de linfocitos y en el desarrollo de órganos linfoides (Hughes & Nibbs; Bonavita, Mollica Poeta, Massara, Mantovani, & Bonecchi, 2018).

2.3 Receptores acoplados a proteínas G (GPCR)

Para que las células respondan a una quimiocina, deben expresar el receptor de quimiocina complementario. Los receptores de quimiocinas pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR): receptores de 7 dominios transmembrana que se unen a ligandos extracelulares e inician por consiguiente la señalización intracelular (Jin et al., 2008).

Los GPCR regulan múltiples funciones biológicas acoplándose a una proteína G heterotrimérica asociada en la superficie interna de la membrana plasmática. El heterotrímero está compuesto por las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$. Tras la activación por la unión de su ligando, la proteína G se une al nucleótido de guanina GDP en su estado basal; se intercambia GDP por GTP, lo que conduce a la disociación de la proteína G en un dímero $\beta\gamma$ y el monómero α activo unido a GTP (Lappano & Maggiolini, 2012).

Las proteínas $G\alpha$ se dividen en cuatro subfamilias principales: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12/13}$ (Pfleger, Gresham, & Koch, 2019). Los GPCR de quimiocinas emiten señales a través de proteínas $G\alpha_i$ y las subunidades $G\beta\gamma$ (Jin et al., 2008). Cuando una quimiocina se une a su receptor se crea una cascada de señal de calcio, que resulta en la activación de GTPasas. Esto provoca una señal intracelular con efectos tales como activación de integrinas (moléculas implicadas en la adhesión celular) y polimerización de actina,

resultando la formación de pseudópodos (proyección celular), polarización de la morfología celular y finalmente movimiento de la célula (Mackay, 2001). Los receptores de quimiocinas se encuentran en una variedad de leucocitos como neutrófilos, linfocitos y células dendríticas. Sin embargo, muchos tipos de células no leucocíticas, incluidas las neuronas, los astrocitos, las células epiteliales, las células mesenquimales y las células endoteliales, pueden expresar receptores de quimiocinas (Hughes & Nibbs, 2018).

2.4 Regulación de la señalización de los GPCR

Los GPCR interactúan con al menos tres familias de proteínas de manera agonista-dependiente. Estas tres familias incluyen (1) las proteínas G heterotriméricas, (2) las cinasas de GPCR o GRK y (3) las arrestinas (Jean-Charles, Kaur, & Shenoy, 2017).

La unión del agonista conduce a un cambio en la conformación del receptor y facilita la activación de la proteína G y la activación posterior de las cascadas de señalización. Dependiendo de la subfamilia $G\alpha$ ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12/13}$), se estimulan diferentes efectores corriente abajo. En términos generales, las familias G_s y G_i afectan la concentración de cAMP intracelular, aumentándolo y disminuyéndolo, respectivamente, al regular la actividad de la adenilato ciclasa (AC), mientras que G_q actúa a través de la fosfolipasa C (PLC) y $G_{12/13}$ activa la señalización de GTPasas (Neves, Ram, & Iyengar, 2002).

Para evitar la sobre activación dañina y mantener la homeostasis, las cinasas de GPCR (GRK) fosforilan el receptor, lo que conduce al reclutamiento de las arrestinas que obstaculizan estéricamente la unión de la proteína G y, posteriormente, terminar la señalización de la proteína G y, por lo tanto, desensibilizar el receptor (Deng, Moo, Inoue, & Brauner-Osborne, 2023). Sin embargo, algunos GPCR se internalizan de forma independiente a la arrestina, como el receptor del péptido 1 similar al glucagón, el receptor de dopamina D3 y el receptor de angiotensina II tipo 1 (Deng et al., 2023).

2.5 El nuevo receptor de quimiocinas GPR15/BOB

GPR15 es un miembro de la familia de GPCR de la clase A. Los GPCR de clase A son el objetivo farmacológico de GPCR más investigado (Basith et al., 2018). GPR15 es un objetivo terapéutico potencial para enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, la enteropatía por VIH, la colitis y la dermatitis (Adamczyk et al., 2021; Ammitzboll et al., 2019; Cartwright, Schmutz, Askari, Kuiper, & Middleton, 2014; Fernandez-Ruiz et al., 2022; Hayn et al., 2021; Kim et al., 2013; Nguyen et al., 2015). El receptor GPR15 se acopla preferentemente a proteínas de la clase $G_{i/o}$, activando a todos los subtipos dentro de la familia (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_{oA} , G_{oB} y G_z). Además, GPR15 emite señales a través de $G_{i/o}$ para inhibir la acumulación de AMPc, que puede bloquearse mediante la aplicación de la toxina pertussis inhibidora de $G_{i/o}$ (Deng et al., 2022).

Se ha descrito que GPR15 comparte identidad de secuencia con los receptores de angiotensina II AT1 y AT2, receptor de interleucina 8b y los receptores huérfanos GPR1 y AGTL1 (Heiber et al., 1996). Además, comparte un 25-30% de identidad de secuencia de aminoácidos con el receptor de quimiocinas CCR5, y, además, con CXCR4 y CXCR2 (Deng, Unutmaz, KewalRamani, & Littman, 1997; Cartwright, Schmutz, Askari, Kuiper, & Middleton, 2014).

El receptor de quimiocinas CCR5, por ejemplo, regula el tráfico y las funciones efectoras de los linfocitos T efectores/memoria, macrófagos y células dendríticas inmaduras. También sirve como el principal correceptor para la entrada de cepas R5 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1, VIH-2). La unión de quimiocinas a CCR5 conduce a la activación de las proteínas $G_{\alpha i}$. Al igual que otros GPCR, CCR5 está regulado por procesos dependientes de agonistas que implican la fosforilación dependiente de la cinasa GRK, la desensibilización mediada por beta-arrestina y la internalización (Oppermann, 2004).

2.6 El ligando endógeno de GPR15: GPR15L/ C10orf99

GPR15L es un polipéptido de 9 kDa similar a la familia de quimiocinas CC, codificado por el gen humano C10orf99 (*2610528A11Rik* en ratón). Previamente se describió que GPR15L tiene una actividad quimioatrayente como ligando de GPR15 (Suply et al., 2017; Ocon et al., 2017). Recientemente se identificó a GPR15L como un agente inductor del prurito que activa a los receptores acoplados a proteínas G relacionados a Mas (MRGPR) causando la degranulación de mastocitos, además, la expresión de GPR15L está fuertemente regulada al alza en la dermatitis atópica (Tseng & Hoon, 2022).

C10orf99 (GPR15L) se expresa de manera ubicua en tejidos epiteliales como tracto gastrointestinal, cuello uterino y piel (Suply et al., 2017; Hayn et al., 2021; Dainichi et al., 2022). La expresión en el colon es constitutiva y moderadamente afectada por la inflamación o la presencia de microbiota (Ocon et al., 2017). En la piel GPR15L contribuye al desarrollo de la psoriasis al promover la proliferación de queratinocitos (C. Chen et al., 2018), de manera independiente de GPR15 (Sezin et al., 2019).

Muchos receptores de quimiocinas son promiscuos, aún no se sabe si esta propiedad también se observa para GPR15-GPR15L. El GPR15L comprende un dominio C-terminal conservado involucrado en la activación y señalización del receptor, mientras que en otras quimiocinas es el extremo N-terminal el que es crítico para la activación del receptor (Suply et al., 2017; Ocon et al., 2017).

2.7 Vía de señalización de GPR15-GPR15L

GPR15L ejerce actividades similares a las de las quimiocinas, incluida la inhibición de la producción de cAMP dependiente de $G\alpha_i$, la señalización de Ca^{2+} , el reclutamiento de beta-arrestina y la migración *in vitro* de células transfectadas que expresan GPR15 (Okamoto & Shikano, 2021; Suply et al., 2017; Ocon et al., 2017; Foster et al., 2019).

Sin embargo, sabe poco acerca de las interacciones entre GPR15 y GPR15L; Okamoto Y y Shikano S describen que la sulfatación de la tirosina en el dominio N-

terminal de GPR15 promueve la unión con el ligando, mientras que la O-glicosilación la disminuye (Okamoto & Shikano, 2021), por lo cual es sumamente relevante caracterizar la vía de señalización de GPR15 en un modelo fisiológico y describir la regulación de esta interacción para modular su efecto en las enfermedades inflamatorias donde está involucrado este receptor.

2.8 Trabajo previo *in silico*

Al no existir reportada una estructura tridimensional cristalizada del receptor GPR15 sobre la cual se pudiera medir la afinidad de los fármacos a reposicionar, se realizó un modelado 3D por homología a partir de la secuencia FASTA del receptor de quimiocinas CCR5. En bases de datos públicas (GPCRdb, DrugBank) de fármacos ya conocidos para receptores de GPR15 se seleccionaron fármacos que inhiben a los receptores GPCR que tienen mayor homología con GPR15. Se realizó acoplamiento molecular de los fármacos sobre la estructura modelada y optimizada de GPR15 inactiva. Se seleccionaron los mejores candidatos para estudios *in vitro* considerando que es mejor opción utilizar los que tuvieron mejores afinidades (menor ΔG) en la proteína modelada por nuestro equipo de trabajo (datos no publicados).

3. JUSTIFICACIÓN

La respuesta inflamatoria se desencadena por factores como infecciones, daño tisular o enfermedades autoinmunes. Los mecanismos de inflamación culminan en el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación. La migración celular es un mecanismo fundamental para la defensa inmunitaria y la reparación de células y tejidos. Las quimiocinas son mediadores proinflamatorios que dirigen la migración leucocitaria mediante la activación de sus receptores, los GPCRs. Dentro de estos se encuentra el receptor quimiotáctico GPR15, que es un objetivo terapéutico potencial para enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, la enteropatía por VIH, la colitis, la dermatitis y está relacionado con infarto al miocardio. Nuestro grupo ha trabajado en identificar fármacos por reposicionamiento mediante docking molecular para optimizar procesos y costos, por

lo que en el presente trabajo se realizaron ensayos *in vitro* de aquellos fármacos que sean mejores candidatos para nuevo uso terapéutico. La evaluación de estos fármacos podría tener una aplicación a futuro para tratar enfermedades inflamatorias asociadas a la expresión de GPR15 y las vías de señalización que este receptor activa.

4. HIPÓTESIS

Los posibles antagonistas de GPR15: loratadina, nedocromil, pranlukast y cromolín compiten con el agonista GPR15L y afectan la movilización de beta-arrestina, la señalización por Ca^{2+} y la migración celular mediada por GPR15.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* posibles inhibidores de GPR15: loratadina, nedocromil, pranlukast y cromolín identificados mediante ensayos *in silico*.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar un modelo celular de expresión de GPR15.
- Evaluar la citotoxicidad de los posibles inhibidores de GPR15: loratadina, nedocromil, pranlukast y cromolín, por citometría de flujo.
- Evaluar el efecto en la migración mediada por GPR15 en respuesta a su ligando GPR15L, mediante ensayos de migración de Transwell y su efecto en presencia de los posibles inhibidores: loratadina, nedocromil, pranlukast y cromolín.
- Evaluar la activación de GPR15 en el modelo de expresión mediante la inmunodetección de beta-arrestinas 1/2 por western blot y citometría de flujo.
- Medir la actividad de GPR15 estimulado con su ligando GPR15L, mediante ensayos de flujos de Ca^{2+} y su efecto en presencia de los posibles inhibidores de GPR15: loratadina, nedocromil, pranlukast y cromolín.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Reactivos

Loratadina (Sigma-Aldrich, #L9664), Pranlukast hemihydrate (Sigma-Aldrich, #P0080), Cromolín (Sigma-Aldrich, #C0399), Lymphoprep™ (Axis-Shield Diagnostics, UK), anticuerpo monoclonal de ratón anti-GPR15 (R&D Systems, USA, #MAB3654), anticuerpo fluorescente IgG de cabra anti-ratón IRDye 800 CW (LI-COR, USA, #926-32210), anticuerpo fluorescente IgG de cabra anti-conejo IRDye 680LT (LICOR, USA, #926-68021), anticuerpo monoclonal de ratón anti-GPR15-PE (BioLegend, USA, #373003), anticuerpo monoclonal de ratón anti-beta-arrestina 1 (MyBioSource, #MBS606737), anticuerpo policlonal de conejo anti-beta-arrestina 2 (Novus Biologicals, #NBP2-24569), anticuerpo monoclonal de ratón anti-beta-actina (Santa Cruz Biotechnology, #sc-58673), anticuerpo policlonal de conejo anti-GPR15L (Sigma, USA, lot: A113752), anticuerpo policlonal de cabra Dylight 680 (Novus Biologicals, #NBP1-72951), buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA), inhibidores de proteasas (Calbiochem® Protease Inhibitor Cocktail #539131), membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm (Bio-rad #162-0112), paraformaldehído al 4% (PFA), buffer de saponina 0.1% (PBS con saponina al 0.1% y suero fetal bovino al 10%), RPMI 1640 w/stable glutamine (Gibco, USA), yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, #P-4170), BB-CI-amidina (Sigma, USA, #SML2250), DPBS (PBS con Ca²⁺/Mg²⁺ y piruvato de sodio 1 mM), EDTA (CTR scientific, lot: 220579), A23187 (Sigma-Aldrich, #C7522), Fluo-4, AM *cell permeant* (Molecular Probes, #F14201), human CXCL16 (PeproTech, USA), custom peptide synthesized GPR15L (Biomatik, USA).

7.2 Comité de bioética y recolección de material biológico

Este proyecto contó con un dictamen de aprobación a consideración del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS para el protocolo titulado: “Papel de GPR15/GPR15L en la fisiopatología de la artritis reumatoide”, con número de registro **R-2018-785-032**. Para la recolección de las muestras humanas, se extrajeron muestras frescas de sangre periférica de sujetos sanos por venopunción en tubos

morados con EDTA (4-5 mL) y estas muestras fueron procesadas con Lymphoprep™ para la separación por densidad de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células polimorfonucleares (PMN). El conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer y se determinó el porcentaje de viabilidad considerando >90% como óptimo para la realización de los ensayos.

7.3 Western blot

Para la obtención del extracto proteico, una vez aisladas las células, se agregó buffer RIPA adicionado con inhibidores de proteasas 1x (Calbiochem® Protease Inhibitor Cocktail). La muestra obtenida fue centrifugada a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976); mediante la curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) se obtuvo la concentración de proteína total por medio de la ecuación de la recta.

Se realizó western blot por fluorescencia para identificar a GPR15 y a beta-arrestinas 1 y 2 en extracto proteico de células PMN. Se hizo la electroforesis SDS-PAGE 10% en condiciones desnaturalizantes a 150 volts por 1 h 30 min. La transferencia húmeda se hizo en una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm de poro (BIO-RAD, USA) a 300 mA por 2 h. El bloqueo se realizó con leche baja en grasa al 5%. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GPR15 1:500 (R&D Systems, USA) y el anticuerpo fluorescente IgG de cabra anti-ratón IRDye 800 CW 1:30,000 (LI-COR, USA). Para las beta-arrestinas 1 y 2 se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-beta-arrestina 1, 1:500 (MyBioSource, USA) y el anticuerpo policlonal de conejo anti-beta-arrestina 2, 1:500 (Novus Biologicals, USA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes fueron IgG de cabra anti-ratón IRDye® 800 CW 1:15,000 y el IgG de cabra anti-conejo 680LT IRDye® 800 CW 1:15,000 (LI-COR, USA). Las membranas se revelaron en un sistema de imagen infrarrojo Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, USA) en el canal de excitación de 700 y 800 nm. Para cada ensayo se realizaron 3 replicados.

7.4 Citometría de flujo

Se realizó inmunomarcaje para detectar a GPR15 por citometría de flujo en la línea celular de cáncer de colon SW620, en PBMC y en PMN. Se sembraron 5×10^5 células en tubos de 12x75 mm y se marcaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GPR15-PE (BioLegend, USA). Se incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente y se adquirieron 10,000 eventos en el canal de PE (575 nm) en un citómetro de flujo FACS Canto II (Beckton Dickinson, USA). Los datos obtenidos fueron procesados en FlowJo V10.

7.5 Ensayos de citotoxicidad

Se aislaron PBMC de sujetos sanos con el método de separación con Lymphoprep™ y se sembraron 5×10^5 células en medio RPMI 1640 (Gibco) en placas de 48 pozos y luego se cultivaron con concentraciones logarítmicas base 10 (1 nM-100 μ M) de loratadina (Sigma-Aldrich), pranlukast (Sigma-Aldrich) y cromolín (Sigma-Aldrich). Se incubaron por 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. En seguida se pasó el contenido de cada pozo en tubos de 12x75 mm para después agregar yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 7.5 μ g/mL y se dejaron incubar por 10 minutos. Se adquirieron 10,000 eventos en el canal de PE (575 nm) en un citómetro de flujo FACS Canto II (Beckton Dickinson, USA). Los experimentos se hicieron de manera independiente en tres ocasiones. Los datos obtenidos fueron procesados en FlowJo V10.

7.6 Tinción intracelular

Para observar el efecto de GPR15L en la activación de las beta-arrestinas en PBMC se llevó a cabo una tinción intracelular utilizando un buffer de permeabilización de saponina. Se sembraron 5×10^5 células en medio RPMI sin suplementar y se agregó el estímulo GPR15L 450 nM y el vehículo DMSO, se incubaron por 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo las células se pasaron a tubos de 12x75 mm y se fijaron con 100 μ L de PFA al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron con PBS a 1200 rpm por 10 minutos. Las células se permeabilizaron con buffer de saponinas al 0.1% por 15 minutos a 4 °C y después se incubaron con 1 μ g del

anticuerpo de conejo anti-beta-arrestina-2 por 30 minutos a 4 °C y se lavaron con buffer de saponinas para eliminar el exceso de anticuerpo primario. En seguida se agregó el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo Dylight (680) a una dilución de 1:500 y se incubó por 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Se adquirieron 10,000 eventos en el canal de APC-A (660 nm) en un citómetro de flujo FACS Canto II (Beckton Dickinson, USA). Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado. Los datos obtenidos fueron procesados en FlowJo V10.

7.7 Ensayos de migración en cámara de Transwell

Se aislaron PBMC de sujetos sanos y se sembraron 5×10^5 células en medio RPMI sin suplementar (Gibco) sobre el inserto Transwell que tiene una membrana de policarbonato de 5 μm de tamaño de poro (Costar® Transwell®, 6.5mm, TC treated, 5.0 mm pore size, in a 24-well cluster plate with lid, USA, #3421). Estas células se incubaron 24 h a 37 °C con 5% de CO_2 para acondicionarlas a las condiciones de cultivo celular. Para los experimentos de migración se agregaron en los pozos inferiores los estímulos quimiotácticos; como control positivo se usó la quimiocina humana CXCL16 a 20 nM (PeproTech), se agregó el péptido GPR15L a 450 nM (Biomatik) y como control negativo se usó DMSO (vehículo de GPR15L). Además, se probaron 2 condiciones inhibitorias; en la primera condición se bloqueó al receptor GPR15 con 1.25 μL de anticuerpo monoclonal de ratón anti-GPR15-PE (BioLegend, USA) sobre el inserto Transwell, y en la segunda condición se bloqueó al ligando GPR15L con 0.1 μg el anticuerpo policlonal de conejo anti-GPR15L (Sigma, USA) en el pozo inferior, durante 30 minutos. Luego a ambas condiciones se les agregó GPR15L 450 nM en el pozo inferior. Loratadina, pranlukast y cromolín se incubaron sobre el inserto Transwell durante 1 h y luego se les agregó GPR15L 450 nM en el pozo inferior. Una vez añadidos todos los estímulos, las PBMC se incubaron 24 h a 37 °C con 5% de CO_2 . Se tomaron microfotografías del pozo inferior con el microscopio invertido Leica DMI (Leica Microsystems) utilizando el programa Leica EC4 Basic MicroscopeCamera. Se tomaron cinco fotografías para cada muestra en forma de zig-zag al azar comenzando por la esquina superior izquierda y terminando en la esquina

inferior derecha y se realizó el conteo celular en el software ImageJ. El experimento se repitió de forma independiente en tres ocasiones.

7.8 Ensayos de flujos de calcio

Se aislaron PBMC de sujetos sanos con el método de separación con Lymphoprep™ y se sembraron 5×10^5 células en tubos de 12x75 mm. Como medio celular y fuente de calcio se utilizó DPBS (PBS con $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y piruvato de sodio 1 mM). Las células se incubaron 1 h con concentraciones logarítmicas (1 nM-10 μM) de loratadina, pranlukast y cromolín y luego se añadió a cada tubo GPR15L 450 nM (Biomatik) y se incubó por 30 minutos. En la condición de bloqueo de GPR15L se utilizó el anticuerpo policlonal conejo anti-humano C10ORF99 (Sigma, USA) y se incubó por 30 minutos. Como control negativo se utilizó EDTA 5 mM y como control positivo A23187 2 μM (Sigma-Aldrich). Las células se incubaron con 1 μM de Fluo-4, AM por 30 minutos a 37 °C. Se adquirió la condición basal por 30 segundos y la condición estimulada por 60 segundos en el canal de Alexa-Fluor (488 nm) en un citómetro de flujo FACS Canto II (Beckton Dickinson, USA). Los ensayos se realizaron de manera independiente por 3 ocasiones. Los datos obtenidos fueron procesados en FlowJo V10.

7.9 Análisis estadístico

Para determinar la normalidad y homocedasticidad de los datos se utilizó la prueba de D'agostino & Pearson. Para evaluar las diferencias entre los grupos, se realizó ANOVA de una vía, seguido de un post test de Tukey y para los datos no paramétricos se realizó un análisis de Kruskal-Wallis seguido del post test de Dunn. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas una $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism 8.0.2.

8. RESULTADOS

8.1 GPR15 se expresa en PBMCs y en mayor abundancia en PMNs de sujetos sanos.

Con la finalidad de encontrar un modelo de expresión en donde pudiésemos analizar de manera fisiológica la respuesta a estímulos de la vía GPR15/GPR15L, estudiamos la expresión en células que previamente han reportado la expresión de GPR15 como es el caso de Fernández-Ruíz et. al., que demuestra la expresión de GPR15 en leucocitos de sangre periférica de pacientes con AR, específicamente en linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, y en menor frecuencia en sujetos sanos.

Nosotros nos enfocamos en la abundancia del receptor en sujetos sanos y lo evaluamos por citometría de flujo tanto en PBMCs como en PMNs aislados de sangre periférica. La frecuencia de expresión de GPR15 en sujetos sanos varía entre el 3%-6% de PBMCs GPR15⁺ (**Figura 1A**) y, en neutrófilos se encontró una abundancia de más del doble respecto a los linfocitos, con una frecuencia del 13.6% como se muestra en la **Figura 1B**. También analizamos a GPR15 por western blot en extracto proteico de PMN para evaluar la cantidad de proteína en nuestro modelo celular (**Figura 2**).

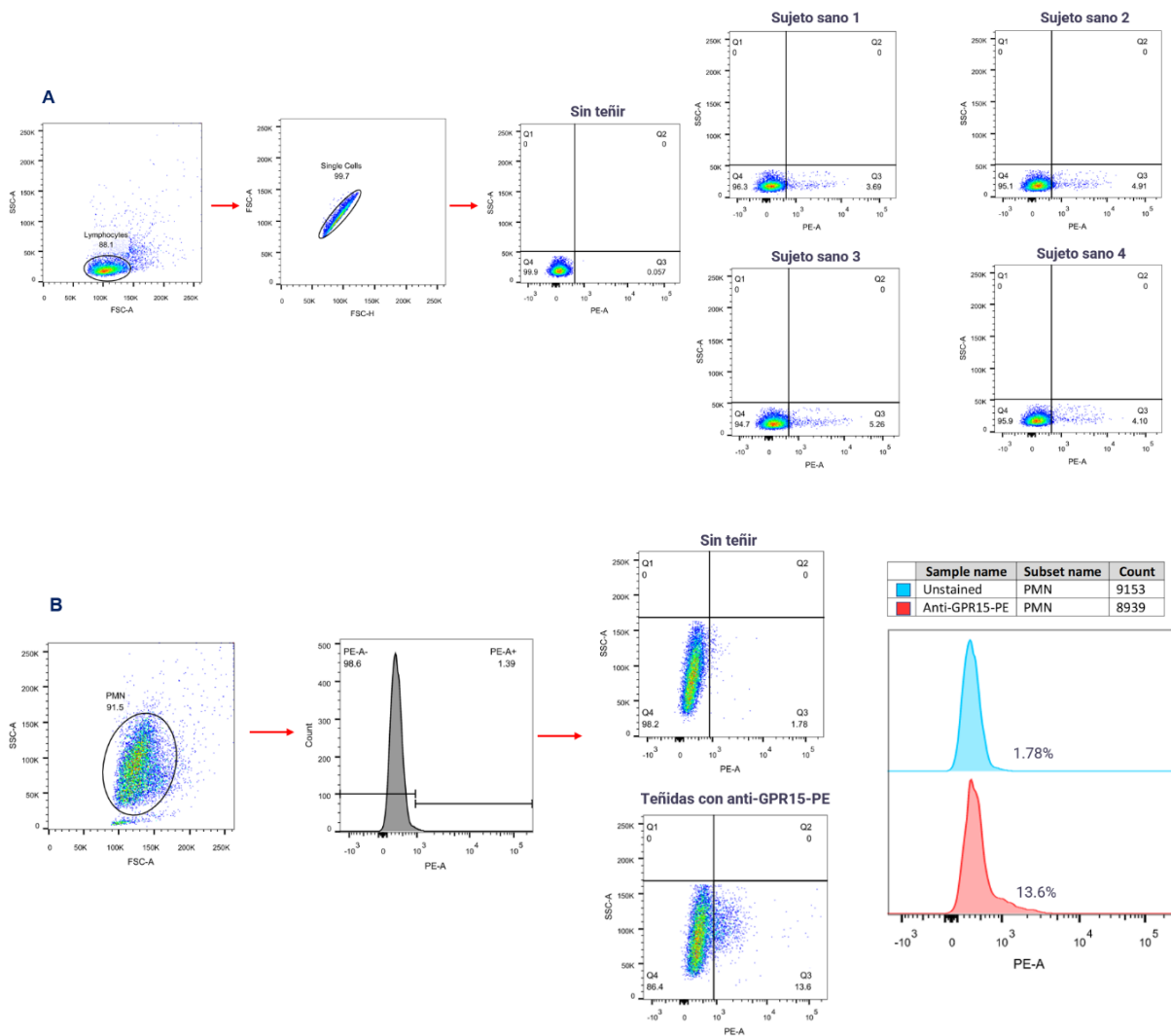


Figura 1. Detección de GPR15-PE en PBMC y PMN por citometría de flujo. Estrategia de gating para la selección de la población GPR15⁺ de **A)** linfocitos y **B)** polimorfonucleares de varios sujetos sanos. Se adquirieron 10,000 eventos para cada muestra en el canal de PE (575 nm) en un citómetro de flujo FACS Canto II. Los datos obtenidos fueron procesados en FlowJo V10.

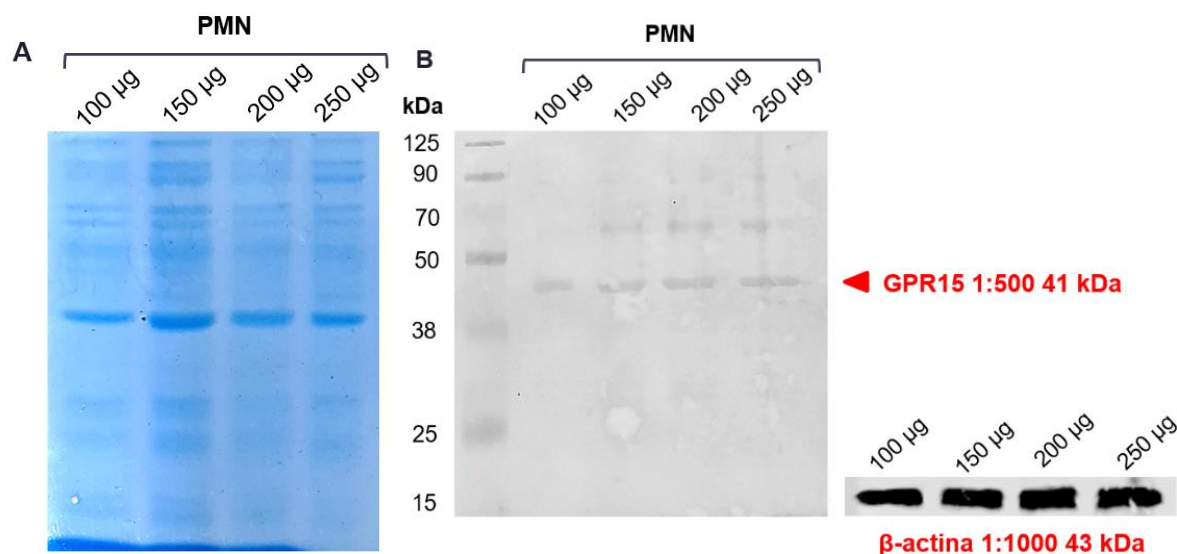


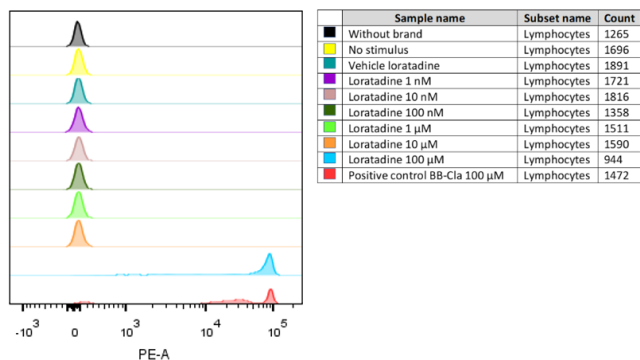
Figura 2. Inmunodetección de GPR15 en células PMN por western blot. A) Después de la electroforesis SDS-PAGE al 10 % en condiciones desnaturalizantes, el gel de poliacrilamida se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R-250 para ver la integridad del extracto proteico. B) Inmunodetección de GPR15 por fluorescencia. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GPR15 1:500 (R&D Systems, USA) y el anticuerpo fluorescente IgG de cabra anti-ratón IRDye 800 CW 1:30,000 (LI-COR, USA). Las membranas se revelaron en un sistema de imagen infrarrojo Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, USA) en el canal de excitación de 800 nm.

8.2 Loratadina, pranlukast y cromolín no muestran efecto citotóxico en PBMCs de sujetos sanos.

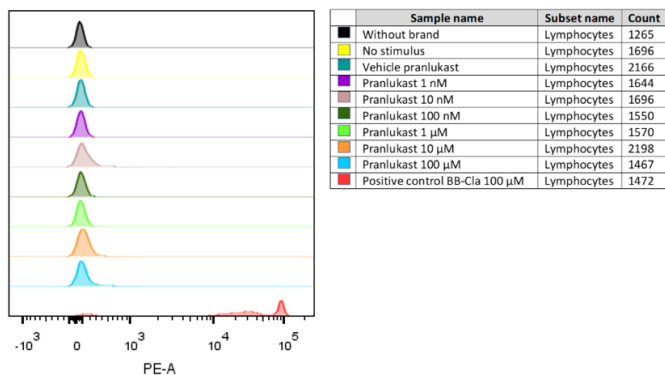
Una vez definido el modelo celular de estudio y dado que nuestro grupo había identificado mediante ensayos *in silico* un conjunto de potenciales inhibidores de GPR15, procedimos a evaluar en nuestros modelos celulares que no observásemos efectos tóxicos de estos compuestos a las concentraciones que habríamos de utilizar en los ensayos de inhibición. Para esto, se evaluó la citotoxicidad de loratadina, pranlukast y cromolín en PBMC de sujetos sanos y se tomaron en cuenta las concentraciones comúnmente usadas en ensayos *in vitro*. Se probó un rango de concentraciones logarítmicas base 10 de 1 nM a 100 µM y se midieron por citometría de flujo (**Figura 3A-C**). Como control de muerte celular se utilizó BB-CI-Amidina 100 µM, ya que en nuestro grupo de investigación este compuesto se utiliza como inhibidor de las peptidil arginina deiminasas (PAD) y se observó que tiene efecto citotóxico en

esa concentración. Loratadina mostró efecto citotóxico significativo ($p < 0.05$) en la concentración más alta de 100 μM respecto al vehículo, donde mató al 97% de las PBMC (**Figura 3D**). En el caso de pranlukast el control de muerte celular tuvo diferencias significativas respecto al vehículo ($p < 0.05$), y no hubo diferencias en las demás concentraciones evaluadas (**Figura 3E**) al igual que cromolín (**Figura 3F**).

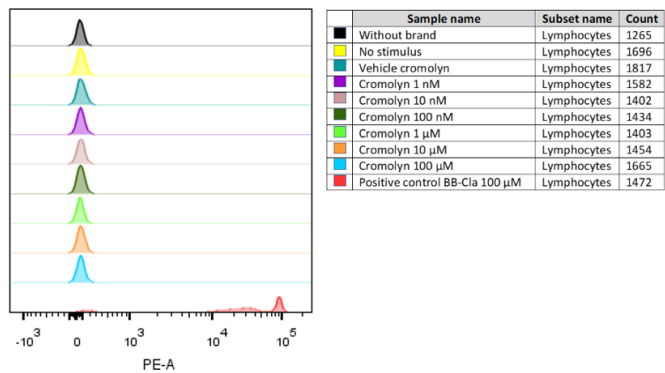
A



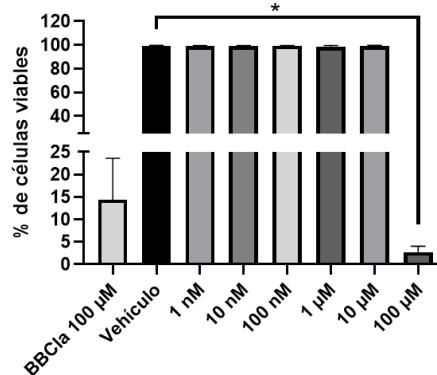
B



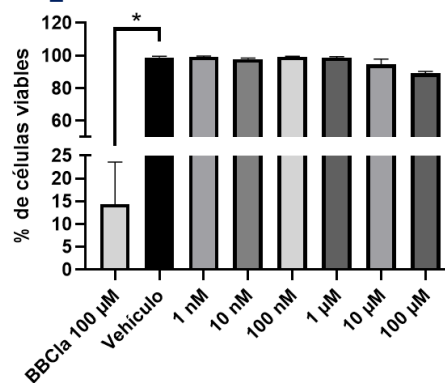
C



D Loratadina



E Pranlukast



F Cromolín

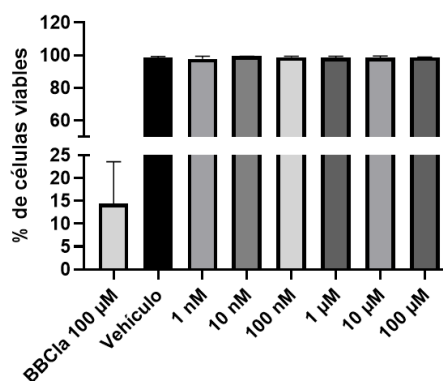


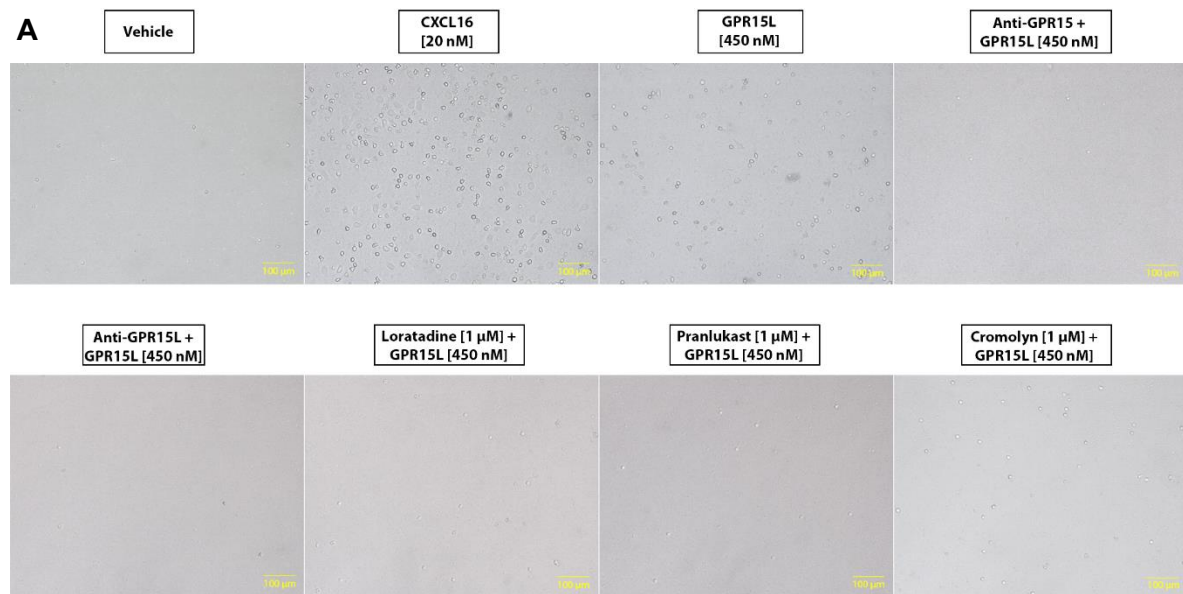
Figura 3. Efecto de loratadina, pranlukast y cromolín en la viabilidad de las PBMC. Se sembraron 500,000 células en placas de 48 pocillos y se incubaron durante 24 h con cada fármaco. Se incubaron con yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron durante 10 minutos. Se utilizó BB-CI-amidina como control positivo. Se adquirieron 10,000 eventos para cada muestra en el canal PE (575 nm) en un citómetro de flujo FACS Canto II (Beckton Dickinson, EE. UU.). Los datos obtenidos fueron procesados en FlowJo V10. **A)** Histograma que muestra las poblaciones negativas y positivas a PI expuestas a varias concentraciones de loratadina, **B)** pranlukast y **C)** cromolín. **D-F)** Porcentaje de células viables tras el tratamiento con cada fármaco. En la gráfica se muestra la mediana y el rango intercuartílico y corresponden a tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de Kruskal-Wallis y un post-test de Dunn ($p < 0.05$).

8.3 Loratadina y pranlukast inhiben la migración mediada por GPR15

La interacción de GPR15L con su receptor GPR15 promueve la quimiotaxis de PBMCs (Fernandez-Ruiz et al., 2022). Para evaluar el efecto de los fármacos en la migración se realizaron ensayos de migración en cámara de Transwell, se utilizó como estímulo principal el péptido sintético de 57 aminoácidos GPR15L 450 nM (Biomatik), comparándolo con su vehículo (DMSO) y CXCL16 como control positivo. Además, para determinar si la quimiotaxis depende de la interacción GPR15/GPR15L, en una condición se bloqueó a GPR15 usando un anticuerpo específico contra GPR15 y en otra condición se bloqueó a GPR15L usando un anticuerpo específico contra GPR15L. Para los estímulos con loratadina, pranlukast y cromolín se utilizó una concentración cercana a GPR15L que fue de 1 μM y en la misma condición se agregó GPR15L 450 nM para observar si había una competencia entre el ligando y los fármacos.

En la **Figura 4A** se muestran microfotografías representativas de PBMCs de sujetos sanos que migraron a través de la cámara de Transwell, en la que se muestra una reducción de la migración en presencia de loratadina y pranlukast; este efecto no lo observamos con cromolín. En la **Figura 4B** se muestra la cuantificación de este fenómeno al contar el número de células migrantes; la migración de PBMCs aumenta al agregar la quimiocina CXCL16 y al agregar GPR15L. Al bloquear con anticuerpos específicos, contra el receptor o el ligando (GPR15 o GPR15L) se observa una reducción en la migración que es consistente con ensayos previamente reportados por

nuestro grupo de trabajo (Fernandez-Ruiz et al., 2022). Se observa un fenómeno similar en una reducción de la capacidad de migración con loratadina y pranlukast. En el caso de cromolín muestra una tendencia al aumento de la migración al igual que GPR15L. Loratadina y pranlukast podrían ser inhibidores de la migración causada por GPR15 y sugerimos que cromolín pudiese estar actuando como un agonista del receptor.



B Inhibición de la migración mediada por GPR15

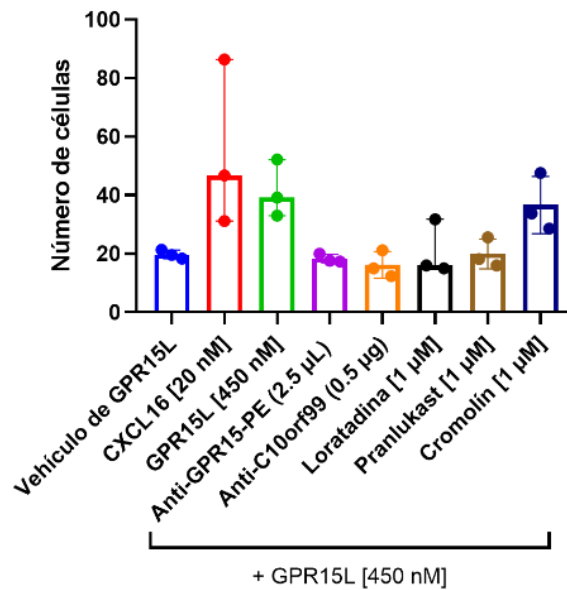


Figura 4. Ensayo de migración en cámara Transwell en PBMC. **A)** Fotografías representativas de PBMC migrantes de sujetos sanos a las 24 h de recibir los estímulos correspondientes. **B)** Gráfico que representa el número de PBMC migrantes para cada condición después de la estimulación. Las fotografías se tomaron con el microscopio invertido Leica DMI usando el objetivo de alta potencia 20x y el software Leica LAS EZ, el panel se construyó usando el software ImageJ v1.0. En la gráfica se muestra la mediana y el rango intercuartílico y corresponden a tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de Kruskal-Wallis y un post-test de Dunn ($p < 0.05$).

8.4 La señalización de GPR15 por activación de GPR15L es independiente de β -arrestina 2.

Cuando los GPCR son activados por su ligando específico se fosforilan por la parte intracelular del receptor por las cinasas de proteínas G (GRK) que reclutan a las proteínas beta-arrestinas para regular la señalización de los GPCR (Wong, Abrams, & Micevych, 2015). Por ello se analizaron a las beta-arrestinas 1 y 2 en neutrófilos por western blot ya que se había identificado a GPR15 en estas células. Sin embargo, es apenas visible la señal de estas proteínas en PMN y en PBMCs no es posible detectar esta proteína mediante western blot o no se observan las proteínas en los tamaños moleculares reportados, observándose otros fragmentos y una baja señal de las proteínas beta-arrestinas 1 y 2 (**Figura 5**).

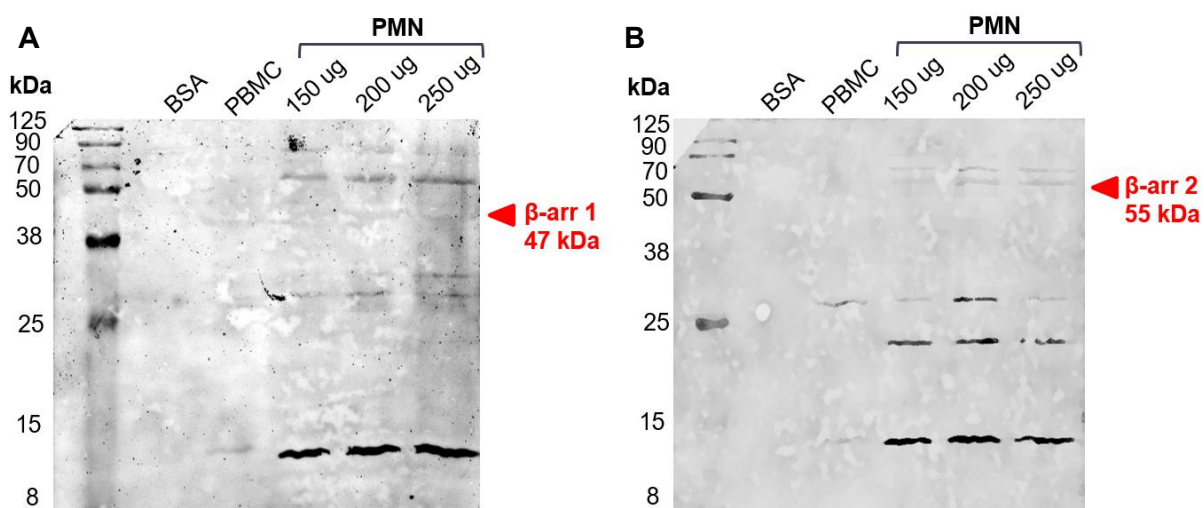


Figura 5. Inmunodetección de β -arrestinas 1 y 2 en extracto de proteína de células polimorfonucleares. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes en geles de

acrilamida al 10%. Se utilizó como control positivo PBMC y BSA como control negativo. **A)** Detección de beta-arrestina-1 con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IRDye 800 CW 1:15,000 (LI-COR, USA). **B)** Detección de beta-arrestina-2 con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IRDye 680 CW 1:15,000 (LI-COR, USA). Las membranas se revelaron en un sistema de imagen infrarrojo Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, USA) en los canales de excitación de 700 y 800 nm.

Adicionalmente, se buscó evaluar el efecto de GPR15L sobre la activación de beta-arrestina-2 ya que anteriormente se describió que tras la activación de GPR15, beta-arrestina-2 se recluta en la membrana de células HEK293A (Deng et al., 2023). Se realizó una tinción intracelular para detectar a beta-arrestina-2 en PBMC por citometría de flujo y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la estimulación con GPR15L y su vehículo ($p < 0.05$), por lo que esto sugiere que la activación GPR15/GPR15L ocurre de manera independiente de la señalización de beta-arrestina-2 (**Figura 6A-B**).

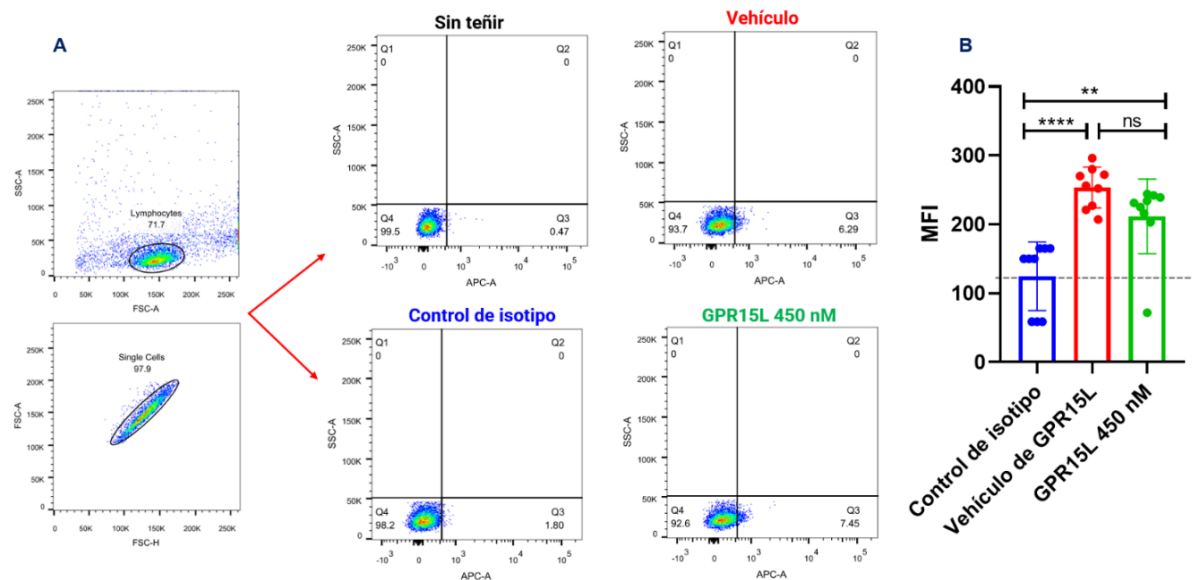


Figura 6. Tinción intracelular de beta-arrestina-2 en PBMC por citometría de flujo. Se cultivaron 500,000 PBMC y se estimularon con GPR15L 450 nM por 24 h. Se incubaron con el anticuerpo primario de conejo anti-beta-arrestina-2 por 30 minutos a 4 °C y con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo Dylight (680) a las mismas condiciones. Se adquirieron 10,000 eventos para cada muestra en el canal APC en un citómetro de flujo FACS Canto II. **A)** Estrategia de gating para la selección de la población de PBMCs beta-arrestina-2⁺. **B)** En la gráfica se observa la media y la desviación estándar y

corresponden a tres ensayos independientes por triplicado. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de una vía y un post-test de Tukey ($p < 0.05$).

8.5 Loratadina y pranlukast estimulan la entrada de calcio en PBMC.

Se ha reportado que GPR15 y su interacción con GPR15L produce un incremento intracelular de calcio en mastocitos (Tseng & Hoon, 2022) y desencadena la señalización de calcio en células transfectadas con GPR15 como las CHO-K1 (Hayn et al., 2021; Ocon et al., 2017; Suply et al., 2017), sin embargo, las respuestas funcionales en linfocitos no han sido evaluadas.

Para medir la actividad de GPR15, las PBMCs de sujetos sanos se estimularon con GPR15L para evaluar el aumento del calcio intracelular. Se midió la señal de calcio con el indicador de calcio Fluo-4, AM por citometría de flujo. Se utilizó como control positivo A23187 (**Figura 7A**) y como control negativo el quelante de calcio EDTA (**Figura 7B**). Adicionalmente se midió el calcio en respuesta a GPR15L por un intervalo de 0 a 20 minutos para ver en qué momento se induce una señal de calcio, pero no se observó en este modelo fisiológico (**Figura 7C**). Además, cuando se puso a competir al ligando con cada uno de los fármacos, parece que al igual que GPR15L, loratadina no induce señal de calcio, solamente una tendencia al incremento (**Figura 7D**). Únicamente la concentración más alta de pranlukast muestra diferencias significativas respecto a la condición basal (**Figura 7E, $p < 0.05$**). En el caso de cromolín, no hubo aumento de la señal de calcio ni en la concentración más alta de 10 μM (**Figura 7F**).

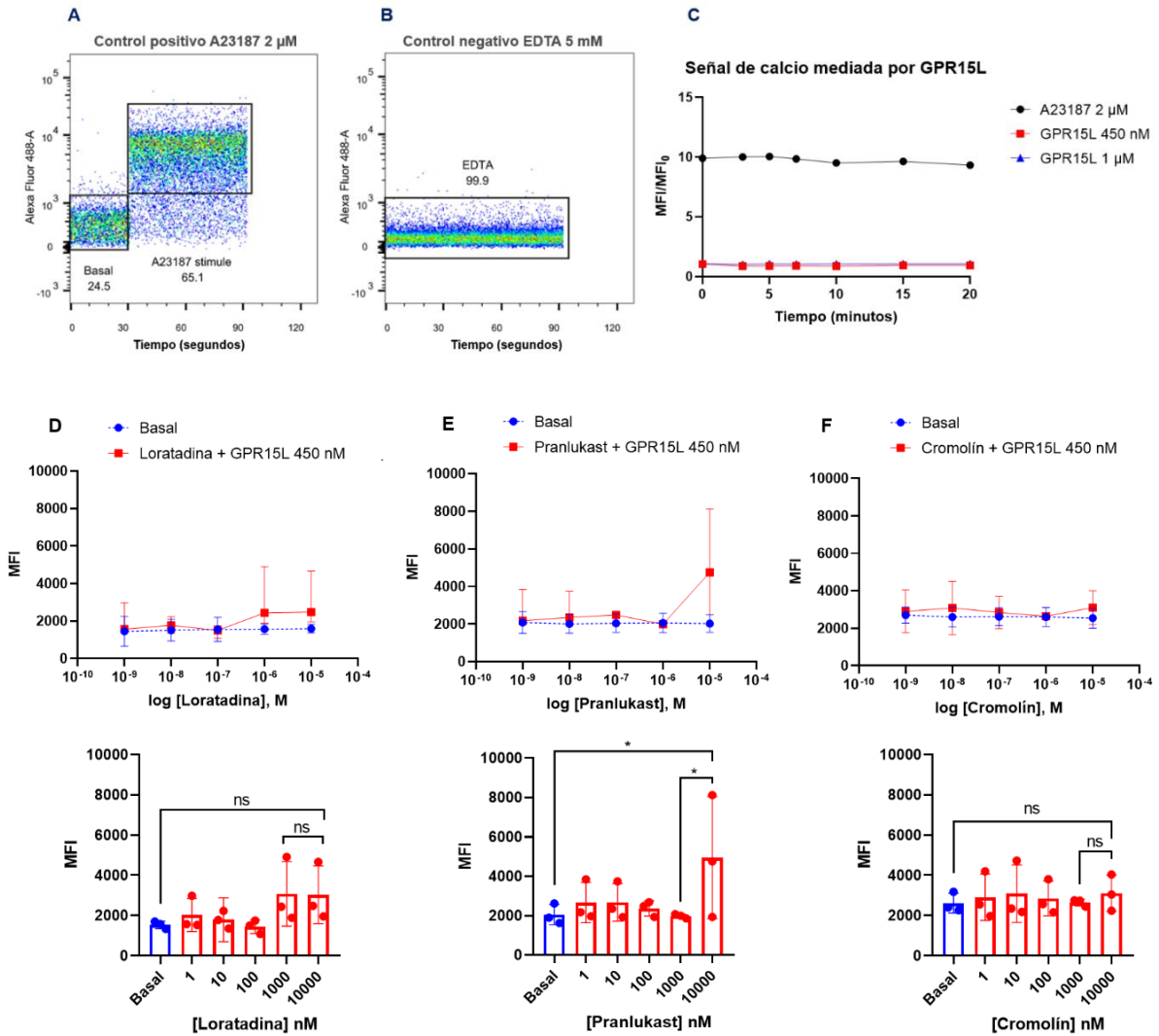


Figura 7. Ensayos de flujos de calcio con Fluo-4, AM en PBMCs. Se sembraron 500,000 células en tubos de citometría de 12x75 mm y se incubaron con Fluo-4, AM 1 μ M por 30 minutos a 37° C. **A)** Se midió la basal por 30 segundos y se agregó el ionóforo de calcio A23187 2 μ M que se adquirió inmediatamente por 60 segundos. **B)** Las PBMC se incubaron con EDTA 5 mM por 30 minutos y la muestra se adquirió por 90 segundos. **C)** A los tubos se les agregó GPR15L 450 nM y 1 μ M y se adquirieron en un intervalo de tiempo de 0 a 20 minutos. Las PBMCs se incubaron con varias concentraciones de **D)** loratadina, **E)** pranlukast y **F)** cromolín por 30 minutos a 37° C. Para cada tubo se adquirió una condición basal y con estímulo. La lectura se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACS CANTO II (BD, Beckton Dickinson, USA). El análisis de los datos de citometría de flujo se llevó a cabo en los archivos FCS 3.0 después de la exportación en Flow Jo Software v. 10.4 (Flow Jo LLC, EE. UU.). Los datos corresponden a 3 ensayos independientes. Las gráficas XY representan la

mediana y el error, y cada punto el IC 95%; las gráficas de barras representan la media y la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías y un post test de Tukey ($p < 0.05$).

9. DISCUSIÓN

La señalización de la mayoría de los GPCR a través de proteínas G termina con la fosforilación del receptor por las cinasas GRK y la unión posterior de proteínas arrestinas, que reconocen selectivamente los receptores fosforilados activos (Gurevich & Gurevich, 2019). Las beta-arrestinas forman parte de la maquinaria endocítica de los GPCRs por su capacidad para obstaculizar estéricamente el acoplamiento de la proteína G de los GPCRs activados por su agonista, lo que en última instancia da como resultado la desensibilización del receptor (DeWire, Ahn, Lefkowitz, & Shenoy, 2007).

En las células humanas, las señales de Ca^{2+} están reguladas por la enzima fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$) que coordina la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ de los GPCR. La $PLC\beta$ actúa convirtiendo el lípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), y esto es seguido finalmente por un aumento brusco y transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ (Pfeil et al., 2020). Los GPCR de quimiocinas emiten señales a través de las subunidades de proteínas G: $G\alpha_i$ y $G\beta\gamma$, que a su vez regulan una diversidad de vías de transducción de señales involucradas en la quimiotaxis (Jin et al., 2008). GPR15 se acopla preferentemente a $G_{i/o}$ (Deng et al., 2022). Los receptores acoplados a proteínas $G\alpha_i$ como tal no activan la $PLC\beta$ para inducir la señalización de Ca^{2+} , sino que, son las subunidades $G\beta\gamma$, que se liberan en grandes cantidades, las que activan a la $PLC\beta$, específicamente las isoformas $PLC\beta_2$ y β_3 (Dhyani et al., 2020; Nowycky & Thomas, 2002; Pfeil et al., 2020).

La migración celular está involucrada en diversos procesos fisiológicos que incluyen la embriogénesis, la inmunidad y enfermedades como el cáncer y las enfermedades inflamatorias crónicas. Las quimiocinas se unen a sus receptores, los GPCR, y guían el movimiento celular *in vivo* (Jin et al., 2008). GPR15 es un receptor de quimiocinas no convencional que está involucrado en trastornos inmunitarios como la enteropatía

inducida por el virus de la inmunodeficiencia humana, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, colitis ulcerativa, cáncer colorrectal, y es un factor de riesgo para el infarto agudo al miocardio (Adamczyk et al., 2021; Ammitzboll et al., 2019; Cartwright et al., 2014; Fernandez-Ruiz et al., 2022; Hayn et al., 2021; Kim et al., 2013; Nguyen et al., 2015). GPR15 se encuentra predominantemente en leucocitos como linfocitos T CD4+ y CD8+, linfocitos T reguladores FOXP3+, en macrófagos CD68+ y CD14+ de tejido sinovial, entre otros. Nosotros evaluamos la abundancia de GPR15 en leucocitos de sujetos sanos. En condiciones normales GPR15 se expresa en PBMC y en células PMN de sujetos sanos, con una frecuencia del ~5% y ~13% en PBMC y PMN, respectivamente.

Se ha descrito que GPR15 tiene un papel potencial en la quimiotaxis de PBMC dependiente de su ligando endógeno GPR15L, y esto aumenta en enfermedades mediadas inmunológicamente como la artritis reumatoide (Fernandez-Ruiz et al., 2022). Aunado a esto, en el presente estudio también se encontró que GPR15L induce la quimiotaxis mediada por GPR15 en PBMC de sujetos sanos. Adicionalmente, se añadieron como condiciones los posibles inhibidores obtenidos de la predicción de los ensayos *in silico*. Los resultados mostraron que loratadina y pranlukast tienden a inhibir la migración mediada por GPR15, mientras que cromolín actuó estimulando la migración tal como lo hace el ligando endógeno de GPR15: GPR15L. Loratadina y pranlukast son medicamentos comúnmente utilizados para asma y rinitis alérgica, y cromolín es un estabilizador de mastocitos (Mazurek, Berger, & Pecht, 1980; Randall & Hawkins, 2018; Yokomizo, Nakamura, & Shimizu, 2018).

Loratadina actúa sobre los receptores de histamina H1; en general, las PBMC no expresan el receptor de histamina H1 de manera significativa (Kmiecik, Otocka-Kmiecik, Gorska-Ciebiada, & Ciebiada, 2012), no obstante, se ha descrito que la subpoblación de linfocitos del tipo Th1 y células dendríticas pueden expresar a este receptor (Vanbervliet et al., 2011). Se reportó que, en un cultivo primario de células del estroma endometrial de ratón, loratadina tiene efectos en la inhibición de la migración y en el bloqueo dependiente de la concentración de la entrada de Ca²⁺ mediada por

TRPV2 (receptor de potencial transitorio vaniloide 2), siendo loratadina el antagonista más potente de TRPV2 (Van den Eynde et al., 2022). Los TRPV se encuentran en la membrana de la célula y funcionan como canales iónicos permeables a cationes como el Ca^{2+} (Pumroy et al., 2022). TRPV2 tiene una distribución tisular muy amplia, con expresión observada en las células inmunitarias, la placenta, el endometrio, el corazón y el sistema nervioso central y periférico. Se ha descrito que la expresión de TRPV2 en PBMC se reduce tras un infarto agudo al miocardio (Rozenbaum et al., 2018).

De acuerdo con esto, nosotros observamos que al estimular a las PBMC con loratadina+GPR15L la migración celular se atenúa, aunque se adicione el ligando de GPR15 que ya se sabe estimula la quimiotaxis; por lo que sugerimos que loratadina puede estar interactuando con GPR15 ocasionando un impedimento estérico para que GPR15L no pueda unirse a GPR15 y estimular la migración. Adicionalmente, nuestros datos sugieren que este mecanismo de inhibición de la migración está moderadamente mediado por la movilización de calcio intracelular y es independiente de la abundancia de beta-arrestina-2. Se requiere un análisis más profundo de la vía de señalización para identificar si la movilización de beta-arrestina a diferentes compartimentos celulares está asociado con el fenómeno de migración en PBMCs inducido por GPR15L. Deng y Cols. describen que GPR15 recluta a beta-arrestina-2 en la membrana de células HEK293A tras la estimulación del agonista, pero que GPR15 se internaliza de manera independiente de arrestinas, esto lo evalúan con el método BRET, en cambio, la internalización de GPR15 es moderadamente dependiente de GRK y clatrina, y altamente dependiente de caveolina y dinamina (Deng et al., 2023).

Pranlukast actúa sobre el receptor-1 de cisteinil leucotrieno (CysLT1), antagonizando al leucotrieno D4. CysLT1, se expresa en leucocitos de sangre periférica, principalmente en eosinófilos (Evans, 2002), y muestra una baja expresión en la superficie celular de linfocitos T, cuyos niveles basales son del 2.5%. En cambio, el aumento en la expresión de CysLT1 en linfocitos T es mayor en individuos sensibilizados a alérgenos a diferencia de individuos sanos (Thivierge, Turcotte, Rola-Pleszczynski, & Stankova, 2015). Dicho esto, un estudio describe que pranlukast tiene

efecto inhibitorio sobre la transmigración de eosinófilos y es altamente específico para la vía dependiente de CysLT1 (Nagata, Saito, Kikuchi, Hagiwara, & Kanazawa, 2005). También, se ha reportado que pranlukast inhibe los influjos de calcio en células beta-pancreáticas y en eosinófilos humanos a través de la interacción con CysLT1 (Hwang et al., 2018; Ohshima et al., 2002).

De acuerdo con los resultados obtenidos, sugerimos que el efecto de pranlukast sobre la inhibición de la migración puede ser posible por la interacción con GPR15, ya que la adición concomitante con GPR15L no genera respuesta de migración celular. Nuestros datos sugieren que, la disminución de la migración mediada por pranlukast es altamente dependiente de calcio e independiente de beta-arrestina-2 en PBMC, a diferencia de lo reportado en otros estudios donde pranlukast no tiene efecto en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, en otros tipos celulares.

Cromolín no actúa directamente sobre los receptores de histamina o leucotrienos, se utiliza más bien como un tratamiento profiláctico. Se sabe que actúa evitando la degranulación de mastocitos, sin embargo, su mecanismo de acción no está bien detallado. Se ha descrito que la entrada de iones Ca^{2+} en la célula desencadena el proceso de desgranulación y secreción, y se ha postulado que el efecto de cromolín puede ser mediante la inhibición de la afluencia de calcio, pero no es un bloqueador general de los canales de calcio (Mazurek, 1980). En un estudio se reportó que cromolín actúa como agonista del receptor acoplado a proteína G GPR35, y que estimula los influjos de calcio en células transfectadas con este receptor. GPR35 está acoplado a proteína $G\alpha_q$ por lo que se esperaría una señal de calcio a través de la vía PLC. No obstante, no se describe nada acerca de su efecto en la migración (Yang et al., 2010). En PBMC solo se ha descrito que cromolín inhibe la producción de citocinas, sin embargo, no se ha detallado su función en la migración en estas células (Matsuse et al., 1999). Nuestros resultados muestran que cromolín no indujo migración en mayor medida que GPR15L ni cambios en la señal de calcio, esto puede sugerir que no está interactuando con GPR15 y lo que se observa solamente es el efecto de GPR15L.

Con base en los resultados obtenidos, sugerimos que loratadina y pranlukast tienden a disminuir la migración mediada por GPR15/GPR15L de manera dependiente de calcio e independiente de beta-arrestina-2. En nuestro modelo fisiológico no fue posible detectar señal de calcio por la activación de GPR15 con su ligando GPR15L, por lo que se requieren estudios adicionales para poder detectar esta señal en el mismo modelo de estudio.

10. CONCLUSIONES

Se caracterizó la vía de señalización de GPR15 en un modelo fisiológico y se evaluó su funcionalidad en la migración como receptor de quimiocinas. Loratadina y pranlukast pueden ser los nuevos inhibidores del blanco terapéutico GPR15, y esto lo hacen de manera dependiente de calcio e independiente de beta-arrestina-2. Cromolín no mostró efectos sobre la migración y la señalización de calcio, lo que indica que no se está uniendo a GPR15 para inducir estos efectos.

11. PERSPECTIVAS

- Detectar la traslocación de beta-arrestinas 1 y 2 del citoplasma al núcleo mediante microscopía confocal.
- Utilizar un modelo animal con una enfermedad inflamatoria crónica y probar el efecto de los fármacos, extraer PBMC y silenciar a GPR15, para ver que el efecto sea específico del receptor.
- Probar un modelo celular de transfección con GPR15 para medir la señal de calcio mediada por GPR15L y el efecto en presencia de loratadina, pranlukast y cromolín.

12. BIBLIOGRAFÍA

Adamczyk, A., Pastille, E., Kehrmann, J., Vu, V. P., Geffers, R., Wasmer, M. H., . . . Westendorf, A. M. (2021). GPR15 Facilitates Recruitment of Regulatory T Cells to Promote Colorectal Cancer. *Cancer Res*, 81(11), 2970-2982. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-2133

- Ammitzboll, C., von Essen, M. R., Bornsen, L., Petersen, E. R., McWilliam, O., Ratzer, R., . . . Sellebjerg, F. (2019). GPR15(+) T cells are Th17 like, increased in smokers and associated with multiple sclerosis. *J Autoimmun*, *97*, 114-121. doi:10.1016/j.jaut.2018.09.005
- Basith, S., Cui, M., Macalino, S. J. Y., Park, J., Clavio, N. A. B., Kang, S., & Choi, S. (2018). Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Front Pharmacol*, *9*, 128. doi:10.3389/fphar.2018.00128
- Cartwright, A., Schmutz, C., Askari, A., Kuiper, J. H., & Middleton, J. (2014). Orphan receptor GPR15/BOB is up-regulated in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, *67*(2), 53-59. doi:10.1016/j.cyto.2014.02.015
- Deng, Y., Moo, E. V., Almeria, C. V. P., Gentry, P. R., Vedel, L., Mathiesen, J. M., & Brauner-Osborne, H. (2022). Delineation of the GPR15 receptor-mediated Galpha protein signalling profile in recombinant mammalian cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, *131*(2), 104-113. doi:10.1111/bcpt.13738
- Deng, Y., Moo, E. V., Inoue, A., & Brauner-Osborne, H. (2023). Endocytic proteins mediating GPR15 receptor internalization provide insight into the underlying mechanisms. *FEBS Lett*, *597*(11), 1528-1540. doi:10.1002/1873-3468.14622
- DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, *69*, 483-510. doi:10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749
- Dhyani, V., Gare, S., Gupta, R. K., Swain, S., Venkatesh, K. V., & Giri, L. (2020). GPCR mediated control of calcium dynamics: A systems perspective. *Cell Signal*, *74*, 109717. doi:10.1016/j.cellsig.2020.109717
- Eggenhuizen, P. J., Ng, B. H., & Ooi, J. D. (2020). Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci*, *21*(19). doi:10.3390/ijms21197015
- Evans, J. F. (2002). Cysteinyl leukotriene receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, *68-69*, 587-597. doi:10.1016/s0090-6980(02)00057-6
- Fernandez-Ruiz, J. C., Ochoa-Gonzalez, F. L., Zapata-Zuniga, M., Mondragon-Marin, E., Lara-Ramirez, E. E., Ruiz-Carrillo, J. L., . . . Castaneda-Delgado, J. E. (2022). GPR15 expressed in T lymphocytes from RA patients is involved in leukocyte chemotaxis to the synovium. *J Leukoc Biol*, *112*(5), 1209-1221. doi:10.1002/JLB.3MA0822-263RR
- Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2019). GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front Pharmacol*, *10*, 125. doi:10.3389/fphar.2019.00125
- Hayn, M., Blotz, A., Rodriguez, A., Vidal, S., Preising, N., Standker, L., . . . Kirchhoff, F. (2021). Natural cystatin C fragments inhibit GPR15-mediated HIV and SIV infection without interfering with GPR15L signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *118*(3). doi:10.1073/pnas.2023776118

- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*, 285(16), 2944-2971. doi:10.1111/febs.14466
- Hwang, H. J., Park, K. S., Choi, J. H., Cocco, L., Jang, H. J., & Suh, P. G. (2018). Zafirlukast promotes insulin secretion by increasing calcium influx through L-type calcium channels. *J Cell Physiol*, 233(11), 8701-8710. doi:10.1002/jcp.26750
- Jin, T., Xu, X., & Hereld, D. (2008). Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*, 44(1), 1-8. doi:10.1016/j.cyto.2008.06.017
- Kim, S. V., Xiang, W. V., Kwak, C., Yang, Y., Lin, X. W., Ota, M., . . . Littman, D. R. (2013). GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine mucosa. *Science*, 340(6139), 1456-1459. doi:10.1126/science.1237013
- Kmiecik, T., Otocka-Kmiecik, A., Gorska-Ciebiada, M., & Ciebiada, M. (2012). T lymphocytes as a target of histamine action. *Arch Med Sci*, 8(1), 154-161. doi:10.5114/aoms.2012.27295
- Lappano, R., & Maggiolini, M. (2012). GPCRs and cancer. *Acta Pharmacol Sin*, 33(3), 351-362. doi:10.1038/aps.2011.183
- Mackay, C. R. (2001). Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*, 2(2), 95-101. doi:10.1038/84298
- Matsuse, H., Shimoda, T., Matsuo, N., Obase, Y., Fukushima, C., Asai, S., & Kohno, S. (1999). Sodium cromoglycate inhibits antigen-induced cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from atopic asthmatics in vitro. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 83(6 Pt 1), 511-515. doi:10.1016/S1081-1206(10)62861-X
- Mazurek, N., Berger, G., & Pecht, I. (1980). A binding site on mast cells and basophils for the anti-allergic drug cromolyn. *Nature*, 286(5774), 722-723. doi:10.1038/286722a0
- Nagata, M., Saito, K., Kikuchi, I., Hagiwara, K., & Kanazawa, M. (2005). Effect of the cysteinyl leukotriene antagonist pranlukast on transendothelial migration of eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*, 137 Suppl 1, 2-6. doi:10.1159/000085424
- Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science*, 296(5573), 1636-1639. doi:10.1126/science.1071550
- Nguyen, L. P., Pan, J., Dinh, T. T., Hadeiba, H., O'Hara, E., 3rd, Ebtikar, A., . . . Habtezion, A. (2015). Role and species-specific expression of colon T cell homing receptor GPR15 in colitis. *Nat Immunol*, 16(2), 207-213. doi:10.1038/ni.3079
- Nowycky, M. C., & Thomas, A. P. (2002). Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci*, 115(Pt 19), 3715-3716. doi:10.1242/jcs.00078
- Ocon, B., Pan, J., Dinh, T. T., Chen, W., Ballet, R., Bscheider, M., . . . Butcher, E. C. (2017). A Mucosal and Cutaneous Chemokine Ligand for the Lymphocyte Chemoattractant Receptor GPR15. *Front Immunol*, 8, 1111. doi:10.3389/fimmu.2017.01111

- Ohshima, N., Nagase, H., Koshino, T., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Hirai, K., . . . Morita, Y. (2002). A functional study on CysLT(1) receptors in human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*, 129(1), 67-75. doi:10.1159/000065175
- Oppermann, M. (2004). Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal*, 16(11), 1201-1210. doi:10.1016/j.cellsig.2004.04.007
- Pfeil, E. M., Brands, J., Merten, N., Vogtle, T., Vescovo, M., Rick, U., . . . Kostenis, E. (2020). Heterotrimeric G Protein Subunit Galphaq Is a Master Switch for Gbetagamma-Mediated Calcium Mobilization by Gi-Coupled GPCRs. *Mol Cell*, 80(6), 940-954 e946. doi:10.1016/j.molcel.2020.10.027
- Pumroy, R. A., Protopopova, A. D., Fricke, T. C., Lange, I. U., Haug, F. M., Nguyen, P. T., . . . Moiseenkova-Bell, V. Y. (2022). Structural insights into TRPV2 activation by small molecules. *Nat Commun*, 13(1), 2334. doi:10.1038/s41467-022-30083-3
- Randall, K. L., & Hawkins, C. A. (2018). Antihistamines and allergy. *Aust Prescr*, 41(2), 41-45. doi:10.18773/austprescr.2018.013
- Rodriguez-Castro, K. I., Franceschi, M., Miraglia, C., Russo, M., Nouvenne, A., Leandro, G., . . . Di Mario, F. (2018). Autoimmune diseases in autoimmune atrophic gastritis. *Acta Biomed*, 89(8-S), 100-103. doi:10.23750/abm.v89i8-S.7919
- Rozenbaum, Z., Cohen, L., Bigelman, E., Shacham, Y., Keren, G., & Entin-Meer, M. (2018). Downregulated Expression of TRPV2 in Peripheral Blood Cells following Acute Myocardial Infarction Is Inversely Correlated with Serum Levels of CRP and Troponin I. *Cardiology*, 139(3), 169-174. doi:10.1159/000486530
- Suply, T., Hannedouche, S., Carte, N., Li, J., Grosshans, B., Schaefer, M., . . . Bassilana, F. (2017). A natural ligand for the orphan receptor GPR15 modulates lymphocyte recruitment to epithelia. *Sci Signal*, 10(496). doi:10.1126/scisignal.aal0180
- Thivierge, M., Turcotte, S., Rola-Pleszczynski, M., & Stankova, J. (2015). Enhanced cysteinyl-leukotriene type 1 receptor expression in T cells from house dust mite-allergic individuals following stimulation with Der p. *J Immunol Res*, 2015, 384780. doi:10.1155/2015/384780
- Tseng, P. Y., & Hoon, M. A. (2022). GPR15L is an epithelial inflammation-derived pruritogen. *Sci Adv*, 8(24), eabm7342. doi:10.1126/sciadv.abm7342
- Van den Eynde, C., Held, K., Ciprietti, M., De Clercq, K., Kerselaers, S., Marchand, A., . . . Vriens, J. (2022). Loratadine, an antihistaminic drug, suppresses the proliferation of endometrial stromal cells by inhibition of TRPV2. *Eur J Pharmacol*, 928, 175086. doi:10.1016/j.ejphar.2022.175086
- Vanbervliet, B., Akdis, M., Vocanson, M., Rozieres, A., Benetiere, J., Rouzaire, P., . . . Hennino, A. (2011). Histamine receptor H1 signaling on dendritic cells plays a key role in the IFN-gamma/IL-17 balance in T cell-mediated skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 127(4), 943-953 e941-910. doi:10.1016/j.jaci.2010.12.002

- Wong, A. M., Abrams, M. C., & Micevych, P. E. (2015). beta-arrestin regulates estradiol membrane-initiated signaling in hypothalamic neurons. *PLoS One*, *10*(3), e0120530. doi:10.1371/journal.pone.0120530
- Yang, Y., Lu, J. Y., Wu, X., Summer, S., Whoriskey, J., Saris, C., & Reagan, J. D. (2010). G-protein-coupled receptor 35 is a target of the asthma drugs cromolyn disodium and nedocromil sodium. *Pharmacology*, *86*(1), 1-5. doi:10.1159/000314164
- Yokomizo, T., Nakamura, M., & Shimizu, T. (2018). Leukotriene receptors as potential therapeutic targets. *J Clin Invest*, *128*(7), 2691-2701. doi:10.1172/JCI97946
- Zhang, P., & Lu, Q. (2018). Genetic and epigenetic influences on the loss of tolerance in autoimmunity. *Cell Mol Immunol*, *15*(6), 575-585. doi:10.1038/cmi.2017.137