



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

SEDE SUR

Departamento de Farmacobiología

**Efectos del lisofosfatidilinositol (LPI) como un
posible patrón molecular asociado a homeostasis
(HAMP) en las células cebadas**

Tesis que presenta

Lizbeth Magnolia Martínez Aguilar

Para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de tesis: Dra. Claudia González Espinosa

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio 11 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N (Cinvestav) bajo la dirección de la Dra. Claudia González Espinosa.

El trabajo se realizó con el apoyo del Conacyt a través de la beca de maestría con número:**718472**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Claudia González Espinosa por aceptarme en su laboratorio y por su asesoría y apoyo. Le agradezco por su paciencia y consejos, y el tiempo dedicado a mi proyecto y persona.

A mis sinodales, la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo y la Dra. Francisca Pérez Severiano les agradezco sus aportaciones al proyecto y por el tiempo dedicado. A la Dra. Gabirela Rodríguez Manzo le agradezco estar desde el principio del proyecto y continuar a pesar de la situación. A la Dra. Francisca Pérez Severiano le agradezco por unirse al proyecto y por el esfuerzo y dedicación para adaptarse en etapas más avanzadas.

A la Dra. Marina Macía Silva, quien participó en el proyecto en mis dos primeros exámenes y que dadas las circunstancias no pudo continuar. Le agradezco sus aportaciones y tiempo, así como por abrirme las puertas de su laboratorio para aprender la técnica de migración.

Al M. en C. Alfredo Ibarra Sánchez, por el apoyo en la enseñanza de técnicas de laboratorio. Le agradezco mucho su dedicación, paciencia, atención, y consejos, fueron un gran aporte a mi y al trabajo.

Al Técnico Rodolfo Pérez Lagunes por su apoyo técnico.

A mis compañeros de laboratorio, aprendo algo nuevo de cada uno de ellos. Quiero agradecer especialmente a aquellos quienes me brindaron consejos y ampliaron mi conocimiento durante este tiempo, a Zyanya, Dulce, Deisy, Monse, Marian y Frida. Y a mi amigo Daniel, quien me impulsó a mejorar.

Al Dr. Rene Garduño Gutierrez por su asesoría y apoyo en experimentos y resultados de microscopía confocal.

A la Lic. Isabel Angélica Anaya Rubio por sus enseñanzas con la cámara de Boyden

A todos mis profesores del programa de Maestría, aprendí mucho de todos y les estoy completamente agradecida.

Al personal del bioterio por el cuidado y manejo de los animales utilizados para este proyecto.

Al personal de limpieza, mantenimiento y seguridad del Cinvestav por hacer de nuestro ambiente de trabajo un lugar mejor.

I.-INDICE GENERAL

I.-ÍNDICE GENERAL	7-9
II.-ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	10
III.- TABLA DE ABREVIATURAS	11-12
IV.- RESUMEN	13-14
1.- MARCO TEÓRICO	15-43
1.1 Células Cebadas (CCs)	
1.1.1 Generalidades.....	15
1.1.2 Origen.....	15-16
1.1.3 Papel de las CCs en la inmunidad innata y adaptativa.....	16-23
1.1.3.1 Reacciones de hipersensibilidad.....	18-19
1.1.3.2 Inmunidad Innata.....	19-23
1.2 Migración celular	
1.2.1 Migración celular y células cebadas.....	23-24
1.2.1 El citoesqueleto y la polarización celular.....	24-26
1.2.2 Regulación de la migración celular	26-29
1.2.3 Quimioatrayentes de las CCs.....	29-30
1.3- Lípidos bioactivos	
1.3.1 Generalidades.....	31
1.3.2 Lisofosfolípidos/esfingolípidos.....	32
1.3.2.1 Esfingosina-1-fosfato (S1P).....	32-34
1.3.2.2 α - Lisofosfatidilinositol (LPI).....	34-37
1.3.2.2.1 Síntesis y metabolismo	35-37
1.3.2.2.2 El LPI como un posible HAMP.....	37
1.4 GPR55	
1.4.1 Proteínas G _{12/13}	38
1.4.2 Generalidades del GPR55.....	39
1.4.3 Señalización.....	39-40
1.4.4 Funciones del LPI y el GPR55.....	40-41

1.4.4 Relación del binomio LPI/GPR55 con el sistema endocannabinoide.....	41-43
2.- JUSTIFICACIÓN	43
3.- HIPÓTESIS	44
4.- OBJETIVOS.....	44
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos específicos	
5.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	45-53
5.1 Métodos.....	45-50
5.1.1 Animales.....	45
5.1.2 Generación de BMBCs.....	45
5.1.3 Ensayos de desgranulación.....	46
5.1.4 Western-Blot.....	47-48
5.1.5 Inmunofluorescencia.....	48-49
5.1.6 Ensayos de migración en la Cámara de Boyden.....	49-50
5.1.7 RT-PCR.....	50-51
5.2 Diseño experimental	51-53
6.- RESULTADOS.....	54-70
6.1 Efecto del LPI sobre la funcionalidad de las CCs.....	54
6.2 Efecto del LPI sobre vías activadas por el GPR5.....	55-60
6.2.1 Análisis del LPI sobre la fosforilación de ERK 1/2	55-56
6.2.2 Análisis del LPI sobre la fosforilación de proteínas que regulan el citoesqueleto de actina (LIMK y cofilina).....	57-60
6.3 Determinar el posible papel quimioatrayente del LPI sobre las CCs...61-67	
6.3.1 Evaluación del LPI en cambios del anillo de actina cortical.....	61-64
6.3.2 Efecto de la activación del GPR55 en la migración de las CCs..64-67	
6.4 Efectos del LPI en la activación del TLR-4.....	67-70
6.4.1 Efectos del LPI sobre proteínas de la vía clásica del TLR-4.....	67-69
6.4.2 Efectos del LPI en la expresión del mRNA de citocinas inducidas por el TLR-4.....	69-70

<u>7.- DISCUSIÓN</u>	<u>71-82</u>
<u>8.- RESUMEN DE RESULTADOS</u>	<u>83</u>
<u>9.- CONCLUSIONES</u>	<u>83</u>
<u>10.- PERSPECTIVAS</u>	<u>84-85</u>
<u>11.- BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>86-95</u>
<u>V.- ANEXOS</u>	<u>96-99</u>
V.I Materiales	
<u>V.I.I Reactivos</u>	<u>96-97</u>
<u>V.I.II Anticuerpos</u>	<u>98</u>
<u>V.I.III Oligos</u>	<u>99</u>

II.-ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

I.-Tablas

- Tabla 1. Quimioatrayentes de las células cebadas
- Tabla 2. Ligandos cannabinoides y el GRP55

II.-Figuras

- Figura 1. Vías de señalización del Fc ϵ RI
- Figura 2. Vía de señalización del TLR4
- Figura 3. Funciones de los DAMPs condicionales ó HAMPs
- Figura 4. Migración celular
- Figura 5. Clasificación de los lípidos bioactivos
- Figura 6. S1P y las células cebadas
- Figura 7. Síntesis y metabolismo del LPI
- Figura 8. Vía de señalización del GPR55
- Figura 9. Mapa conceptual del diseño experimental
- Figura 10. Efectos del LPI y la S1P sobre las CCs
- Figura 11. Curso temporal de fosforilación de ERK 1/2 con LPI
- Figura 12. Curso temporal de fosforilación de ERK 1/2 con O-1602
- Figura 13. Curso temporal de fosforilación de LIMK y cofilina con LPI
- Figura 14. Curso temporal de fosforilación de LIMK y cofilina con O-1602
- Figura 15. Curso temporal de fosforilación de LIMK y cofilina con S1P
- Figura 16. Reorganización del anillo de actina cortical en respuesta al LPI
- Figura 17. Análisis del perfil de polimerización del anillo de actina cortical
- Figura 18. Migración de las CCs
- Figura 19 Efectos del ML-193 en la migración de las CCs
- Figura 20. Análisis del efecto del LPI sobre la vía de señalización del TLR-4
- Figura 21. Efectos del LPI en la expresión del mRNA de diferentes citocinas
- Figura 22. EL LPI como HAMP de las CCs

III.- TABLA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
2-AG	2-araquidonoilglicerol
AAC	Anillo de actina cortical
AC	Adenilato ciclasa
APC	Células presentadoras de antígeno
BMMCs	Células cebadas derivadas de médula ósea
C1P	Ceramida-1-fosfato
CB₁ o CB₂	Receptor de cannabinoides 1 o 2
CBRs	Receptores de cannabinoides
CCps	Células cebadas progenitoras
CCQ	Células cebadas positivas a quimasa
CCs	Células Cebadas
CC_T	Células cebadas positivas a triptasa
CC_{TC}	Células cebadas de tejido conectivo
CCTM	Células cebadas de tejido mucoso
CC_{TQ}	Células cebadas positivas a quimasa y triptasa
CMH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
DAG	Diacilglicerol
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
eCN	endocannabinoides
FAK	Cinasa de adhesiones focales
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GMPs	Progenitores granulocíticos/monocíticos
GPR55	Receptor 55 acoplado a proteína G
GPRs	Receptor acoplado a proteína G
IgE	Inmunoglobulina E
IP₃	Inositoltrifosfato
ITAMs	Motivos de inmunorreceptor activado por tirosina
LBP	Proteína de unión a lipopolisacárido
LIMK	Cinasa con un dominio LIM
LisoPLC, D o A	Lisofosfolipasa C, D o A
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidil colina
LPI	Lisofosfatidilinositol
LPP 1-3	Fosfatasa de lisofosfolípidos 1-3

LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LPS*	Lisofosfatidil serina
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MLC	Cadena ligera de la miosina
MP	Membrana plasmática
NGF	Factor de crecimiento neural
NK	Células asesinas naturales
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatilinositol-3-cinasa
PIs	fosfatidilinositoles
PKC	Proteín-cinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLA1 o PLA2	Fosfolipasa 1 o 2
PLC-γ	Fosfolipasa C gamma
PTKs	Proteínas tirosin-cinasa
PUA	Proteínas de unión a actina
PUM	Proteínas de unión a microtubulos
RE	Retículo endoplásmico
ROCK	Protein-cinasa asociada a Rho
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S1P	Esfingosina-1-fosfato
S1PR	Receptor de la esfingosina-1-fosfato
SCF	Factor de células troncales
SGPL1	Esfingosina-1-fosfato liasa
SNC	Sistema Nervioso Central
SPHKs	Esfingocinasas
SpK1 o SpK2	Esfosin-cinasa
SPP1 o SPP2	Esfingosina-1-fosfato fosfatasa
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
Δ^9-THC	Δ^9 -Tetrahidrocannabinidiol

IV.- RESUMEN

Las células cebadas (CCs) son células del sistema inmune que participan en respuestas de la inmunidad innata. Para dicha función, expresan receptores como el receptor tipo Toll 4 (TLR-4). El TLR-4 al ser activado desencadena la producción de mediadores inflamatorios en las CCs, lo que contribuye a reacciones de defensa contra patógenos, pero también perpetúa reacciones inflamatorias que son perjudiciales para el organismo.

Recientemente, fue propuesto que varios ligandos pueden regular la activación de las células del sistema inmune mediante su acción sobre receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Este tipo de moléculas son definidas como HAMPs (patrones moleculares asociados a homeostasis), debido a que en condiciones fisiológicas regulan procesos fisiológicos celulares como migración; mientras que, en estados patológicos activan mecanismos antiinflamatorios que retornan a la célula a la homeostasis.

Un grupo de lípidos bioactivos conocidos como lisofosfolípidos, están descritos como HAMPs. Dentro de este grupo destaca el α -lisofosfatidilinositol (LPI), un fosfolípido con una sola cadena acilada con un esqueleto de glicerol y un grupo polar de mioinositol. El LPI es el ligando endógeno del receptor 55 acoplado a proteína G (GPR55), el cual está acoplado a proteínas G12/13.

Debido a lo anterior, fue de interés para este proyecto investigar si el LPI pudiera ser considerado un HAMP para las CCs. Para este fin, se planteó conocer los efectos del LPI sobre las respuestas fisiológicas de las CCs y analizar si ese lípido bioactivo contribuye al regreso a la homeostasis de las CCs inhibiendo la vía de señalización del receptor TLR4.

Se utilizaron CCs derivadas de médula ósea (BMMCs) de ratones *wild type* (WT). Se analizó la activación (fosforilación) inducida por el LPI de proteínas mediante Western-Blot; en condiciones fisiológicas se analizaron las proteínas ERK 1/2, LIMK y cofilina, mientras que en condiciones patológicas se analizaron proteínas de la vía clásica del TLR-4 (ERK1/2, p-38, JNK, IKK, Tak-1 y p-65). Para el estudio de los efectos del LPI sobre la migración celular, se analizó el anillo de actina cortical (AAC) mediante inmunofluorescencia y se realizaron ensayos de migración en la cámara de Boyden. La expresión de diferentes citocinas se evaluó tras un estímulo con LPI, analizando el mRNA de diferentes citocinas inducidas por la activación del TLR-4 con LPS. Como control de la activación del GPR55 se utilizó al O-1602 (agonista) y al ML-193 (antagonista). Como control positivo de la migración se utilizó a otro lípido bioactivo la esfingosina-1-fosfato (S1P).

El LPI en condiciones fisiológicas participa en la activación de proteínas como ERK 1/2, LIMK y cofilina en CCs, induciendo cambios en el anillo de actina cortical y la migración con una potencia mayor a la observada con S1P. En condiciones patológicas, el LPI reguló negativamente la vía de señalización del TLR-4 activada por LPS, al inhibir la fosforilación de proteínas como JNK, IKK y p-64 y el mRNA de diferentes citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, TNF-, TGF-, VEGF, CCL2). Lo anterior nos permite concluir que el LPI actúa como un HAMP en las CCs.

IV.-ABSTRACT

Mast Cells (MC) are cells of the immune system that participate in innate immunity events. For this function, MC express receptors such as Toll like receptor 4 (TLR-4). When activated, TLR-4 produces inflammatory mediators in MC, contributing to host defense mechanisms against pathogens, but also, perpetuating harmful inflammatory reactions for the organism.

Recently, various ligands have been proposed as regulators of the activation of immune cells through their action on G protein coupled receptors (GPCRs). These types of molecules have been defined as HAMPs (homeostasis associated molecular patterns), since under physiological conditions, they regulate cellular physiological events such as migration, while in pathological conditions, they activate anti-inflammatory mechanisms that return cells to homeostasis.

A group of bioactive lipids known as lysophospholipids have been described as HAMPs. Within this group of lipids, α -lysophosphatidylinositol (LPI) stands out. LPI is a phospholipid with a single acylated chain, a glycerol skeleton and a polar group of myoinositol. LPI is the endogenous ligand of G-protein coupled receptor 55 (GPR55), which is coupled to G12 / 13 proteins.

Hence, it was our interest for this project to investigate if LPI could be considered as a HAMP for MC. For this purpose, we studied if LPI participated in MC physiological responses and whether this bioactive lipid could contribute to MC return to homeostasis by inhibiting the TLR-4 signaling pathway.

Bone marrow derived MC (BMDCs) from WT mice were used. LPI-induced activation (phosphorylation) of proteins was analyzed by Western-Blot. Under physiological conditions, ERK 1/2, LIMK and cofilin proteins were studied, while proteins from the classical pathway of TLR-4 (ERK1 / 2, p-38, JNK, IKK, Tak-1 and p-65) were studied under pathological conditions. To study the effects of LPI on cell migration, the cortical actin ring (CAR) was analyzed by immunofluorescence and migration tests were carried out in the Boyden chamber. The expression of various cytokines was evaluated after stimulation with LPI, analyzing the mRNA of different cytokines induced by the activation of TLR-4 with LPS. O-1602 (agonist) and ML-193 (antagonist) were used as control of GPR55 activation. As a positive control of migration sphingosine-1-phosphate (S1P), another bioactive lipid, was used.

LPI under physiological conditions participates in the activation of proteins such as ERK 1/2, LIMK and cofilin in MC, inducing changes in the CAR and migration, with more potency than the one observed with S1P. Under pathological conditions, LPI negatively regulated the LPS-activated TLR-4 signaling pathway, by inhibiting phosphorylation of proteins such as JNK, IKK and p-64 and the mRNA of different cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, TNF-, TGF-, VEGF and CCL2). These results allow us to conclude that LPI acts as a HAMP in MC.

1.- MARCO TEÓRICO

1.1 CÉLULAS CEBADAS

1.1.1 Generalidades

Las células cebadas (CCs) fueron descritas por primera vez por Paul Ehrlich en 1878.⁽¹⁾ Son células centinelas consideradas componentes importantes de las respuestas inmunes innatas y adaptativas.⁽²⁾

Se distribuyen ampliamente en el organismo, encontrándose en tejido conectivo, en regiones subepiteliales y rodeando vasos sanguíneos en músculo liso, nervios, folículos pilosos y glándulas mucosas presentes en piel, tracto respiratorio y tracto digestivo.⁽³⁾ Esta localización estratégica les permite responder de manera rápida contra sustancias y/o organismos patógenos, siendo participantes clave dentro de la etapa inicial de procesos inflamatorios.

Las CCs miden aproximadamente 8-12µm y se caracterizan por la presencia de gránulos electrodensos en su citoplasma. En cada célula pueden encontrarse de 50-200 gránulos que contienen diferentes mediadores.⁽²⁾

Las CCs se clasifican bioquímicamente dependiendo del contenido de sus gránulos. En ratones se clasifican en Células Cebadas de Tejido Conectivo (CCTC), que son ricas en heparina, y en Células Cebadas de Tejido Mucoso (CCTM), pobres en heparina. En humanos, se clasifican de manera diferente dependiendo de la expresión de Triptasa (CC_T) o Quimasa (CC_Q), o bien ambas enzimas (CC_{TQ}).⁽⁴⁾

1.1.2 Origen

Las CCs son células de origen dual. En etapas embrionarias se generan del endotelio del saco vitelino y en el adulto se producen a partir de tejido hematopoyético en la médula ósea.⁽⁵⁾

Está descrito que, en la médula ósea de los seres humanos, derivan de progenitores granulocíticos /monocíticos (PGM), los cuales darán origen a Células Cebadas progenitoras (CCps), CD34/CD117 positivas, a partir de las células troncales hematopoyéticas.⁽⁶⁾ Las CCps deben abandonar los tejidos hematopoyéticos y

migrar a la circulación periférica e invadir todos los tejidos vascularizados, donde proliferarán y se diferenciarán a su forma madura. ⁽⁷⁾ El reclutamiento de las CCps a sus tejidos está mediado por la integrina $\alpha 4\beta 7$, mientras que su maduración depende de la activación del receptor KIT mediada por su ligando, el Factor de Células Troncales (SCF, por sus siglas en inglés) y, en ausencia de éste, se ha demostrado que las interleucinas (IL-) 3 y 6 son capaces de llevar a cabo este proceso. ^(2, 8)

A pesar de que todas las CCs comparten un mismo linaje, la forma madura de las células varía en su morfología y funciones. Esta heterogeneidad se debe a la influencia que ejerce el microambiente del tejido en donde se localizan, así como de las necesidades fisiológicas del organismo. ⁽⁹⁾

1.1.3 Papel de las CCs en la inmunidad innata y adaptativa

Las CCs expresan una amplia diversidad de receptores capaces de reconocer diferentes estímulos inmunogénicos que inducen su activación. El mecanismo más estudiado es la activación mediada por el receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (Fc ϵ RI) que participa en respuestas alérgicas. Si bien es el mecanismo que ha ganado más relevancia, las CCs participan en varios eventos de la inmunidad innata. Actualmente sabemos que las CCs se consideran células multifuncionales, involucradas en diferentes eventos fisiológicos como angiogénesis, vasodilatación, reparación tisular, defensa contra patógenos, regulación del crecimiento óseo y su remodelación, homeostasis de minerales, neurogénesis y tolerancia inmunológica. En la inmunidad adaptativa, participan al presentar antígenos vía el Complejo Principal de Histocompatibilidad (CMH) tipo I y II. Además, regulan la función de otras células del sistema inmune, como macrófagos, células dendríticas, células T o B, fibroblastos, eosinófilos, células endoteliales o epiteliales. ^(10, 11, 12, 13, 14)

Tras su activación, se induce la liberación selectiva y gradual de mediadores inflamatorios. ⁽¹⁵⁾ Para su estudio, los mediadores están clasificados de acuerdo con su forma de producción en pre-formados (almacenados en gránulos secretores de

pH ácido) y sintetizados *de novo*.⁽¹⁶⁾ Los principales mediadores producidos por este tipo celular son los siguientes:^(2, 10)

- Aminas biogénicas: Histamina, serotonina, dopamina y poliaminas. De manera particular, la histamina, fue la primera sustancia estudiada en las CCs y es liberada en abundancia a tiempos muy cortos (15-90 segundos) después de la activación del receptor FcεRI⁽¹⁵⁾.
- Enzimas lisosomales: Como la β-hexosaminidasa, la β-glucuronidasa, la β-D galactosidasa, la arilsulfatasa o varios tipos de catepsinas. La β-hexosaminidasa se utiliza para monitorear el proceso de desgranulación, dado que existen ensayos sensibles y sencillos para monitorear su actividad.
- Proteasas: Como carboxipeptidasa A o G, metaloproteinasas, renina, quimasas y triptasas. Estas dos últimas permiten clasificar a las CCs dependiendo del contenido granular.
- Proteoglicanos: Serpicina, heparina y sulfato de condroitina.
- Citocinas: Es abundante el número de citocinas sintetizadas y liberadas por las CCs. Existen diferentes tipos de interleucinas como IL-4, IL-6, IL-10, IL-15, IL-1, entre otras. Además del Factor de Necrosis tumoral-α (TNF-α) e interferones.
- Factores de crecimiento: Como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF-β), Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), Factor de Crecimiento Neural (NGF) o SCF.
- Péptidos: Como entotelina, endorfina, sustancia P o péptido intestinal vasoactivo.

- Mediadores lipídicos: Prostaglandinas, esfingosina-1 fosfato (S1P), Leucotrienos o factores activadores de plaquetas (PAF).

1.1.3.1 Reacciones de hipersensibilidad

Las reacciones de hipersensibilidad son respuestas exageradas o inapropiadas contra un antígeno o alérgeno. De acuerdo con Gell y Coombs, las reacciones se clasifican en cuatro tipos (I, II, III, IV). Las CCs participan en las reacciones de hipersensibilidad tipo I, que son reacciones alérgicas o anafilácticas, mediadas por la interacción entre la inmunoglobulina E (IgE) con un antígeno (Ag). ⁽¹⁷⁾

La unión de complejos de IgE/Ag al receptor FcεRI permite su entrecruzamiento, provocando su activación. El FcεRI es un receptor multimérico de superficie que puede existir en forma completa (tetramérica), conteniendo una cadena α, una β y un homodímero de cadenas γ unidas por puentes disulfuro. Asimismo, puede existir en una forma incompleta (trimérica) carente de la cadena β y que es expresada únicamente por células presentadoras de antígeno y eosinófilos. ⁽¹⁸⁾

La cadena α tiene dos dominios extracelulares que se unen a IgE, un dominio transmembranal con un residuo de ácido aspártico conservado y una cola citoplasmática corta con 7 sitios de N-glicosilación. ⁽¹⁹⁾ Las cadenas β y γ no reconocen ligandos, éstas tienen motivos de inmuno-receptor activados por tirosina (por sus siglas en inglés, ITAMs) los cuales se fosforilan después del entrecruzamiento antigénico. La cadena β amplifica la señal del receptor, mientras que las γ son esenciales para la señalización. ⁽¹⁸⁾

La vía de señalización del FcεRI (ver Figura 1) es regulada por proteínas cinasas de tirosinas (PTKs) de la familia Src: LYN, SYK y FYN. Y dependiendo de la cinasa que se active, la vía se divide en una vía principal (LYN, SYK) y otra vía complementaria (FYN, SYK). En ambas vías se lleva a cabo una compleja cascada de señalización en la que participan muchas proteínas, que en minutos conducen a la liberación de mediadores pre-formados por un mecanismo de

desgranulación en el que hay una gran movilización de Ca^{2+} , y una estimulación más prolongada permite la síntesis *de novo* de citocinas mediada por la activación de diferentes factores de transcripción. (18)

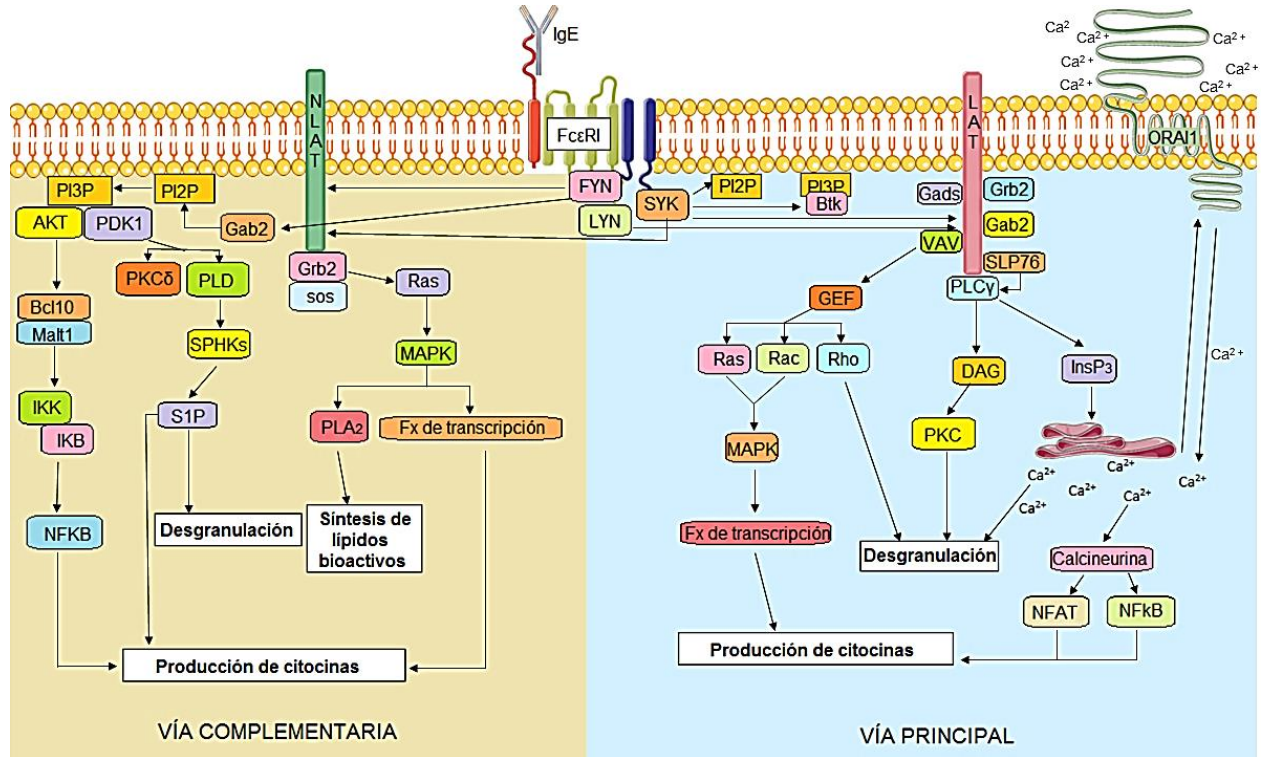


Figura 1. Vías de señalización del FcεRI. La Inmunoglobulina E (IgE) se une al receptor FcεRI, permitiendo su activación y la consecuente fosforilación de proteínas de la familia Src: FYN, LYN y SYK. Se muestra la vía principal LYN-SYK-LAT-PLCγ y la vía complementaria FYN-SYK-NLAT-Gab2. Ambas vías participan en la desgranulación de las CCs, así como en la síntesis de mediadores de inflamatorios. Imagen creada por Martínez-Aguilar, 2020.

1.1.3.2 Inmunidad innata

El sistema inmune innato es el sistema de defensa del huésped más conservado evolutivamente. Y éste está constituido por barreras físicas y químicas, células inmunes y mediadores solubles. (20)

Las CCs son consideradas parte de este sistema, aunque existe un entendimiento limitado de su función en estas respuestas. Respecto al papel de las CCs en la inmunidad innata, Paker y colaboradores (2010)(21) mencionan que de todos los fondos otorgados para proyectos relacionados con CCs por el NIH

desde 1954 (aproximadamente 1000), únicamente el 10% están enfocados en el estudio de la participación de este tipo celular en ese tipo de respuestas inmunes. Sabemos, que como el resto de las células que participan en la inmunidad innata, las CCs expresan receptores que reconocen patrones (PRRs), capaces de reconocer Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) o Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs).

Los PRRs mejor caracterizados en las CCs son los receptores Tipo Toll (TLRs). Los TLRs son una familia amplia de receptores. Son proteínas transmembranales de tipo I, conformadas por 3 regiones: un ectodominio que contiene repeticiones ricas en leucina que reconocen PAMPs o DAMPs; una región transmembranal y un dominio citosólico Toll/IL-1R (TIR), que activa la cascada de señalización.⁽²²⁾ Estos receptores se expresan en diferentes tipos celulares del sistema inmune, como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, linfocitos y CCs. Localizados en la membrana celular (TLR1/2/4/5/6/10) o en la membrana endosomal (TLR3/7/8/9).⁽²³⁾

El TLR4 fue el primero en caracterizarse funcionalmente y en CCs su expresión ya está comprobada,⁽²⁴⁾ así como caracterizada su vía de señalización (ver Figura 2). Su ligando mejor descrito es el lipopolisacárido (LPS) bacteriano producido por bacterias Gram (-), el cual, en macrófagos y células dendríticas, es detectado por la proteína de unión al LPS (LBP) que lo presenta al co-receptor CD14 formando un trímero. El trímero se une al complejo formado por el TLR4 y la proteína de Diferenciación Mieloide 2 (MD-2) lo que activa al receptor.

Una vez activado, promueve el reclutamiento de proteínas con dominio TIR como las proteínas Mal y MyD88, las cuales reclutan a cinasas asociadas al IL-1R conocidas como IRAK-1 y 4 que permiten la ubiquitinación del complejo TRAF-6. A su vez, TRAF-6 ubiquitina a un complejo preformado que contiene a la cinasa TAK-1. Este paso es clave, ya que de aquí se bifurca la señalización, que puede llevar a la cascada de fosforilación de MAPK como ERK 1/2, p-38 y JNK, o bien, se puede activar a la cinasa inhibitoria del NFκB (IKK), lo que genera la fosforilación de la proteína IκBα, la cual es degradada; esto resulta en la

liberación del factor de transcripción NFκB en el citoplasma y su translocación al núcleo. Tanto este factor como los generados por las MAPK están involucrados en la proliferación celular, supervivencia y producción de citocinas como TNF-α, IL-6 o IL-1, entre otras. ⁽²⁵⁾

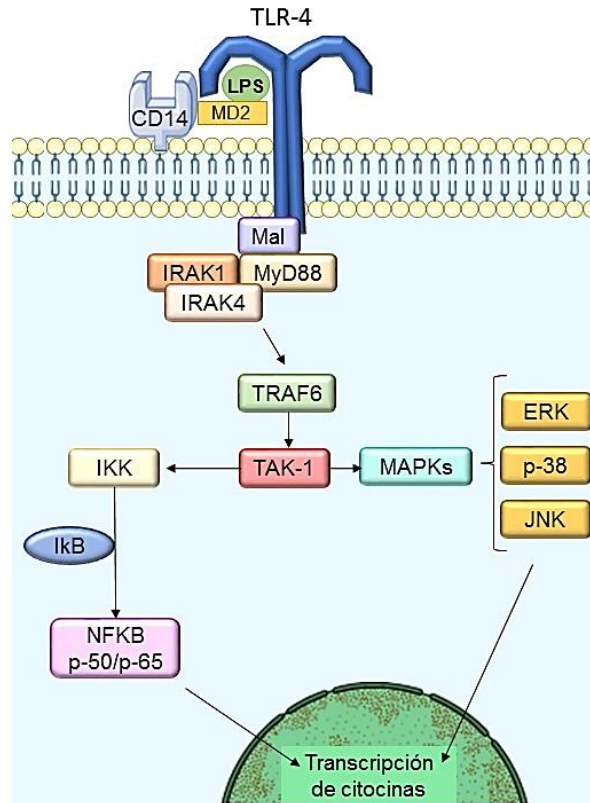


Figura 2. Vía de señalización del TLR4. El LPS activa al TLR4. Su activación induce una cascada de fosforilaciones y ubuquitinaciones que activan a las Proteín-Cinasas Activadas por Mitógeno (MAPK) y a NFκB. Ambas vías favorecen la síntesis de citocinas. Imagen creada por Martínez-Aguilar, 2020.

La activación de los receptores TLR-4 desencadena la producción de mediadores inflamatorios en las CCs, lo que contribuye a reacciones de defensa contra patógenos, pero también perpetúa reacciones inflamatorias que son perjudiciales para el organismo, generando varias patologías. Actualmente, dentro de la inmunidad innata, se conocen otros mecanismos inmunomoduladores que regulan procesos fisiológicos y patológicos, y que necesitan ser considerados para

comprender la participación de las CCs en las respuestas del sistema inmune innato.

Recientemente, se reporta que varios ligandos pueden regular la activación de las células del sistema inmune mediante su acción sobre receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).⁽²⁶⁾ Este tipo de moléculas se definen como DAMPs condicionales o HAMPs (patrones moleculares asociados a homeostasis). Estos DAMPs condicionales o HAMPs (ver Figura 3) se encuentran a bajas concentraciones en estados fisiológicos, regulando funciones celulares como diferenciación, proliferación, actividad metabólica o migración celular. Cuando el organismo pierde la homeostasis, se producen condiciones patológicas, generando un aumento en la concentración de estas moléculas y promoviendo la exacerbación de respuestas inflamatorias o bien, induciendo respuesta anti-inflamatorias que conducen a la homeostasis. El regreso a la homeostasis se da al producir mediadores anti-inflamatorios o regulando la activación de otros PRRs, como los TLRs. En los últimos años, un grupo de lípidos bioactivos conocidos como lisofosfolípidos (LPLs), fueron descritos como HAMPs. Hasta el momento, la información sobre las acciones de HAMPs en CCs es muy escasa.⁽²⁶⁾

Espinosa-Riquer y colaboradores (2019)⁽²⁷⁾, reportaron que otro lípido bioactivo del grupo de endocannabinoides, el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), conduce a respuestas anti-inflamatorias en las CCs. Observaron que induce respuestas de tolerancia al LPS similares a las observadas por la estimulación prolongada del receptor TLR-4, y que la activación del receptor CB2 por 2-AG regula negativamente la activación del TLR-4. Aunque no se comprobaron los efectos de este lípido en estados fisiológicos, ni en un modelo patológico, los resultados son interesantes, ya que otros lípidos bioactivos como los LPLs son considerados como posibles HAMPs.

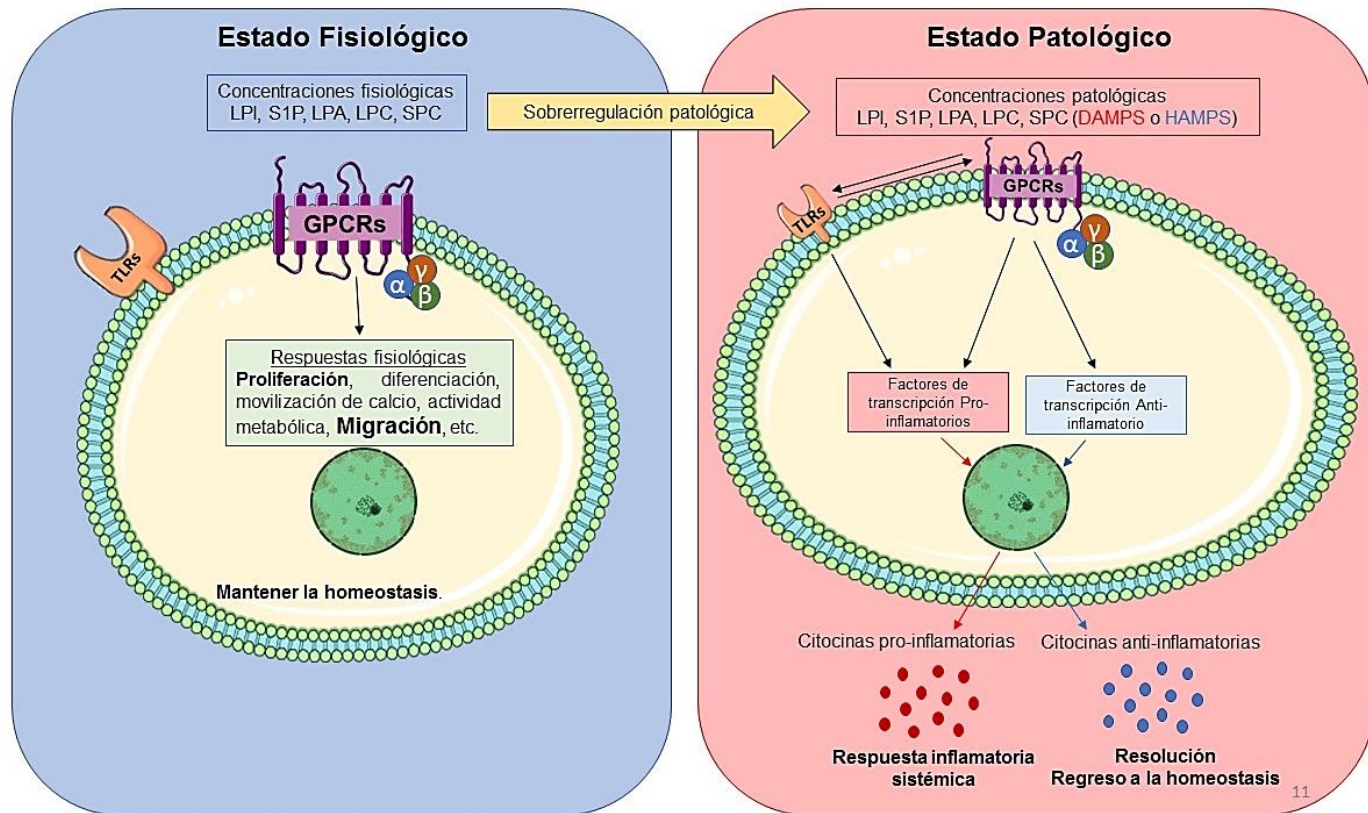


Figura 3. Funciones de los DAMPs condicionales ó HAMPs. Los lípidos bioactivos que funcionan como DAMPs condicionales controlan respuestas fisiológicas en ausencia de daño tisular (panel azul). Sin embargo, al presentarse un estado patológico (panel rosa), aumenta la concentración de esos compuestos, ocasionando la activación de factores de transcripción y el apagado de vías pro-inflamatorias, con el fin de contribuir al regreso de las células a la homeostasis. Imagen tomada y modificada de Wang y colaboradores (2016).⁽²⁶⁾

1.2 MIGRACIÓN CELULAR

1.2.1 Migración celular y CCs

Para que las CCs lleven a cabo sus funciones tanto en las reacciones de hipersensibilidad como en las del sistema inmune innato, tienen que migrar a los sitios donde son requeridas. De tal manera que migran desde la médula ósea como células cebadas progenitoras (CCp) o bien, como CC maduras que se desplazan dentro del tejido en el que se diferenciaron o hacia otros.

Por muchos años se creyó que únicamente las CCp eran capaces de migrar, sin embargo, existe evidencia experimental que demuestra que, ya sea en su forma inmadura, o instaladas en los tejidos residentes, las CCs, en condiciones fisiológicas, migran hacia zonas donde hay contacto con antígenos o donde se

llevan a cabo reacciones inflamatorias. Huang y colaboradores (2008)⁽²⁸⁾ demostraron que las células de hepatocarcinoma H22 son productoras de SCF *in vitro* y cuando inyectaron CCs derivadas de Medula Ósea (BMMCs, por sus siglas en inglés) marcadas fluorescentemente en la vena de la cola de ratones BALB/C con hepatocarcinoma, las BMMCS migraron a los tejidos tumorales. Para comprobar los efectos del SCF como el quimioatrayente responsable de la migración utilizaron al anticuerpo neutralizante de SCF y al anticuerpo bloqueador de c-Kit (receptor del SCF) y demostraron que la migración fue significativamente inhibida, concluyendo que las CCs son capaces de migrar del torrente sanguíneo a sitios de daño y que la migración es mediada principalmente por la liberación de SCF del tejido tumoral.

Por su parte, Silverman y colaboradores (2000)⁽²⁹⁾ purificaron CCs peritoneales de ratas Wistar, las marcaron con colorantes vitales PKH26 o CellTracker Green y las inyectaron en ratas huéspedes. Después de una hora pudieron demostrar la presencia de estas células cerca de vasos sanguíneos talámicos, y que estas células representaban el 2-20% de las CCs cerebrales, concluyendo que CCs maduras son capaces de entrar por el torrente sanguíneo al Sistema Nervioso Central (SNC) a través de un mecanismo de quimioatracción hacia la laminina, IL-3 o TGF- β .

Como CCps o CC maduras, las células se desplazan a sitios donde son requeridas. Para hacerlo se activan diferentes mecanismos en los que participan muchos componentes. En el siguiente capítulo, se detallan algunos de éstos.

1.2.2 El citoesqueleto y polarización celular

El citoesqueleto es una estructura reticular-fibrosa compleja, dinámica y adaptativa cuyos componentes y proteínas regulatorias están en constante flujo. ^(30,31) Tiene tres funciones principales: organizar espacialmente el contenido celular, conectar a la célula física y bioquímicamente con el ambiente intra y extracelular, y generar fuerzas coordinadas que permitan la migración, la endocitosis o exocitosis y la división celular. ^(31,32) Estas funciones están mediadas por tres tipos de filamentos principales: los microtúbulos, los filamentos intermedios, y los microfilamentos. ⁽³⁰⁾

Éstos forman una red altamente estructurada y dinámica resistente a la deformación, capaz de reorganizarse en respuesta a estímulos externos. ⁽³²⁾

Los microtúbulos son cilindros huecos de aproximadamente 25 nm, esenciales para la división celular, el transporte intracelular y la organización de compartimientos en la célula. Están conformados por heterodímeros de subunidades globulares de tubulina α y β , que se ensamblan para formar protofilamentos. Éstos se asocian lateralmente entre sí para formar un microtúbulo: aproximadamente trece protofilamentos conforman un microtúbulo. ⁽³³⁾ Los microtúbulos son estructuras polares, con un extremo positivo, de crecimiento rápido, y uno negativo, de crecimiento lento. Su dinámica de despolimerización y polimerización, así como su organización dentro de la célula están reguladas por diferentes proteínas de unión a microtúbulos (MAPs) que coordinan estos procesos. ⁽³⁴⁾

Los filamentos intermedios son estructuras de 10 nm formados por un arreglo helicoidal de tetrámeros. Existen seis familias de proteínas que los conforman, sin embargo, dos proteínas de la familia III son las más abundantes: la vimentina y la desmina, en una proporción de 6:1 respectivamente. ⁽³⁵⁾ Estos filamentos son resistentes a fuerzas producidas por estrés mecánico, cualidad que les permite anclar y soportar el posicionamiento de los organelos citoplasmáticos de una manera más eficiente que los demás componentes. ⁽³⁶⁾

Los microfilamentos, también conocidos como filamentos de actina, participan en diversas funciones, como mantener la forma celular, la división celular, la formación de uniones intercelulares y célula-sustrato, el tráfico vesicular y, de interés en este trabajo, la migración celular. Los microfilamentos están formados por dos polímeros helicoidales trenzados, de un diámetro de 7nm. ⁽³⁶⁾ Como su nombre lo indica, su componente principal es la actina, que es una proteína monomérica globular (G-actina) de 5 nm de diámetro y 42 kDa, que cuando polimeriza (unión de monómeros de actina) forma actina filamentosa (F-actina).

El proceso de polimerización y despolimerización involucra eventos complejos en el que participan una gran cantidad de proteínas (ver Figura 4B). El proceso inicia con un gasto energético importante, para que los filamentos se estabilicen, se tiene que

formar un núcleo trimérico de actina, proceso conocido como **nucleación**, en el que participan proteínas como Arp 2/3, Wasp y forminas. Al igual que los microtúbulos, los filamentos de actina tienen dos extremos, uno positivo (+) o barbado de crecimiento rápido, y uno negativo (-) o raso, de crecimiento lento; una vez nucleado, el filamento crece de forma rápida por la adición de actina en el extremo (+), proceso en el que participan proteínas conocidas como profilinas. Este evento se conoce como **elongación o polimerización**. La longitud del filamento es controlada por proteínas conocidas como proteínas coronadoras o **capping**, las cuales bloquean la adición de nuevos monómeros de actina. Dentro de éstas encontramos a la CapZ, la gelsolina y la tensina. A su vez, los filamentos se **entrecruzan** entre sí para formar redes de actina. En este paso participan proteínas como filamina, transgelina y α -actinina. Finalmente, el último paso del ciclo es la **despolimerización**, el cual es regulado por el complejo de proteínas conocido como ADF/cofilina. ^(37, 38, 39)

Además del complejo proceso de polimerización/despolimerización, los microfilamentos tienen una característica especial, su localización; ésta puede ser citoplasmática, o bien, cortical, dando origen a un anillo de actina cortical (AAC) o, como algunos autores señalan, el citoesqueleto cortical. ⁽³⁰⁾

El AAC es una red delgada de actina localizada por debajo de la membrana plasmática, en donde los filamentos de actina se organizarán como una malla reticulada densa con más de cien proteínas de unión a actina (PUA), que generarán cierta tensión a la célula necesaria para mantener su morfología. Los cambios en la composición o localización de la corteza de actina dan lugar a gradientes de tensión que inducirán deformaciones y contracciones necesarias para el re-arreglo del citoesqueleto, por ejemplo, en migración. ⁽⁴⁰⁾

1.2.3 Regulación de la migración celular

La migración celular es un proceso fundamental en las respuestas del sistema inmune innato y adaptativo que permite la translocación de un grupo de células o una célula individual a través de los tejidos o fluidos. En mamíferos los procesos de migración son importantes en el desarrollo y morfogénesis, disminuyendo después

de la diferenciación; sin embargo, en procesos patológicos, esta maquinaria se reactiva. ⁽⁴¹⁾ Por otro lado, la migración celular nunca desaparece y es un proceso fundamental en el sistema inmune, ya que la mayoría de las células que lo componen no se encuentran fijas, sino que transitan por los distintos tejidos realizando procesos de vigilancia y protección.

El ciclo de motilidad celular se puede dividir en cuatro fenómenos (ver Figura 4A):^(41,39)

1. **Activación:** La activación se refiere a una señal interna o externa capaz de inducir a la célula a iniciar el movimiento. Tal señal se da, con frecuencia, a través de un receptor o canal iónico, lo que inducirá la polarización de la célula. ⁽³⁹⁾
2. **Polarización:** La polarización está mediada por los filamentos de actina, que permiten una reorganización de la membrana y el citoplasma, generando distribuciones asimétricas de organelos, mecanismos de señalización y receptores, transportadores y canales, focalizándolos en una estructura conocida como “extremo guía”. ⁽⁴¹⁾ El “extremo guía” está formado por protrusiones del AAC que se extienden sobre la matriz extracelular (MEC) en sentido de la locomoción. Son dos las protrusiones importantes: los lamelipodios y los filopodios. Los primeros son protuberancias anchas y planas que se extienden en el frente de la célula; los segundos son procesos celulares delgados que se extienden del lamelipodio y contienen haces paralelos de filamentos cuya función es censar el ambiente local. Opuesta al extremo guía existe una región llamada urópodo, la cual sufre cambios opuestos a los del extremo guía con la finalidad de permitir la polarización. ⁽³⁵⁾
3. **Adhesión célula- matriz extracelular:** La célula en movimiento generará otro tipo de protrusiones: las adhesiones focales. En éstas, las integrinas, a través de sus dominios extracelulares, se pondrán en contacto con la MEC, mientras que los dominios intracelulares se asociarán a proteínas como vinculina y talina, uniéndose de forma indirecta a los filamentos de actina. ⁽⁴¹⁾

Además de las adhesiones focales se encuentran otras protrusiones llamadas invadopodios localizadas en el filopodio; éstas se extienden por pequeños canales de la MEC y se adhieren a fibras de colágeno. Ambas estructuras permiten que la célula se establezca durante el proceso de arrastre. ^(35,41)

4. **Retracción:** Después de las adhesiones focales, señales externas inducen el ensamblaje de fibras de estrés, formadas por microfilamentos, proteínas motoras y otras proteínas de unión a actina. Las fibras de estrés activan a la ATPasa de la actomiosina, generando la fuerza de propulsión necesaria para impulsar a la célula hacia adelante. ⁽³⁵⁾

Como podemos darnos cuenta, los filamentos de actina constituyen una parte importante durante la migración celular. Diferentes receptores pueden fomentar el re-arreglo del AAC en respuesta a diferentes señales y activar numerosas vías de señalización, sin embargo, de todas estas vías, aquellas activadas por proteínas Rho parecen ser fundamentales en este proceso. ⁽³⁶⁾

Las proteínas RhoGTPasas son miembros de la superfamilia RAS de proteínas monoméricas capaces de unirse a GTP e hidrolizarlo mientras transitan en ciclos de activación e inactivación. Existen alrededor de 25 proteínas dentro de este subgrupo, sin embargo tres son esenciales: RhoA, Rac y Cdc42 (ver Figura 4B). Son proteínas que se encuentran en la membrana y deben ser activadas por el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF); una vez activas participan en la reorganización dinámica del citoesqueleto de actina.

La estimulación de RhoA (Figura 4B) activa a la proteína-quinasa asociada a Rho (ROCK), que fosforila proteínas como la cadena ligera de miosina (MLC), la quinasa de adhesión focal (FAK2), la quinasa del fosfatidil-inositol-4-5 bifosfato (PI(4)P-5, PIP5K), el complejo de proteínas mDia y las quinasas con un dominio LIM (LIMK1 y 2). Cada una de estas proteínas participa activamente en el ciclo de migración, favoreciendo la polimerización de actina (mDia) o fibras de estrés (PIP5K), la formación de adhesiones focales (FAK), la contracción (MLC) o, en el caso de LIMK,

como una proteína que favorece ciclos de recambio. ^(42,43) LIMK es una proteína fundamental, ya que regula el proceso despolimerización-polimerización de los filamentos de actina. LIMK fosforila la serina 3 de la proteína cofilina y, de esta forma, inhibe las acciones de esta última. La cofilina participa en el proceso de despolimerización de la F-actina e impide su re-incorporación a los filamentos, esto lo logra ya que se une al ADP de la F-actina y promueve su disociación. Cuando

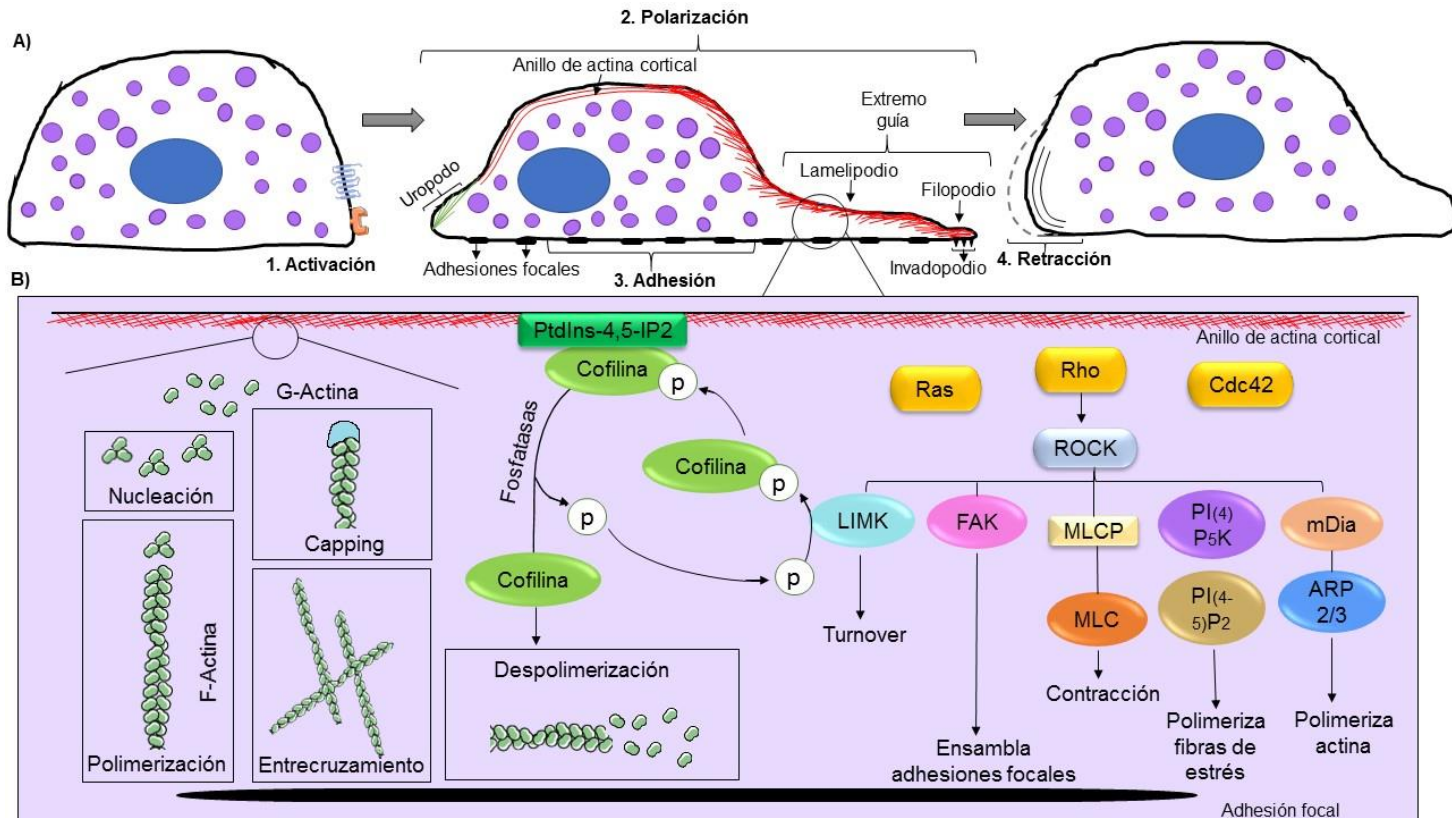


Figura 4. Migración celular. **A)** Ciclo de motilidad celular, se señalan el proceso de activación (1), polarización (2), adhesión (3) y retracción (4), así como los nombres de las estructuras generadas. **B)** En la región izquierda, se observa el ciclo de polimerización/despolimerización de actina: nucleación, polimerización, capping, entrecruzamiento y despolimerización. En la región derecha se muestran a las proteínas Rho (Ras, RhoA y Cdc42), y la vía de señalización mediada por RhoA, destacando el proceso de fosforilación-desfosforilación de la cofilina mediado por LIMK. Imagen creada por Martínez-Aguilar, 2020.

LIMK fosforila a la cofilina, ésta regresa a la membrana plasmática, donde es bloqueada por su unión al fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PtdIns-4,5-IP₂). Diversas fosfatasas serán las encargadas de desfosforilar a la cofilina, permitiendo su liberación y consecuentemente continúe el proceso de despolimerización. Por ello, la actividad de la LIMK, al fosforilar a la cofilina e impedir sus acciones, permite un aumento en la polimerización. ⁽³⁹⁾

1.2.4 Quimioatrayentes de las CCs

Como vimos anteriormente, el primer paso del ciclo de motilidad celular es la activación de receptores que generan una cascada de señalización que culmina con la migración de las células a los sitios requeridos. Las sustancias que generan los gradientes químicos necesarios para activar a los receptores se conocen como quimioatrayentes. ⁽⁴⁴⁾

En las CCs están descritos diversos quimioatrayentes (ver Tabla 1) ⁽⁴⁴⁾ capaces de inducir migración efectiva. Como podemos observar, pertenecen a diversas clases de moléculas como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento o mediadores lipídicos. Cabe mencionar que estos últimos han ganado relevancia en años recientes debido a que todos los quimioatrayentes lipídicos mencionados en la Tabla (S1P, PGE2, PGD2, LTB4, LTD4 o LTC4) pertenecen a una clase de lípidos denominados lípidos bioactivos.

Tipos de quimioatrayentes	Ejemplos
Factores de crecimiento	SCF, TGF- β
Factores activadores	PAF
Inmunoglobulinas	IgE
Mediadores lipídicos	S1P, PGE2, PGD2, LTB4, LTD4, LTC4
Quimiocinas	CCL-1, 3,5, 7, 8, 11, 13, 14, 16, 19, 21, 23, 24, 26, 28, también CXCL-6, 9, 10, 12, 16 o CX3CL1
Citocinas	IL-8, TNF- α
Factores del complemento	C1q, C3a, C5a
Proteínas y péptidos	5-HT, catestatina
Purinas	adenosina

Tabla 1. Quimioatrayentes de las células cebadas (CCs). Esfingosina-1-fosfato (S1P), prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina D2 (PGD2), leucotrieno B4, D4 o C4 (LTB4, LTD4 y LTC4, respectivamente).

1.3 LÍPIDOS BIOACTIVOS

1.3.1 Generalidades

Los lípidos bioactivos son lípidos capaces de activar diferentes vías de señalización y, por ende, regular respuestas inmunológicas e inflamatorias, así como la homeostasis celular.⁽⁴⁵⁾ Se producen a partir de lípidos de la membrana o de componentes dietéticos, con precursores en común de los ácidos grasos poli-insaturados esenciales omega-6 o 3, que son esterificados a lípidos de membrana y que actúan al unirse y activar a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). De acuerdo con Chiurchiú y colaboradores (2016)⁽⁴⁶⁾, los lípidos bioactivos se clasifican en 4 grupos: los eicosanoides clásicos, los mediadores especializados pro-resolvedores, lisofosfolípidos/esfingolípidos y endocannabinoides. (Ver Figura 5)

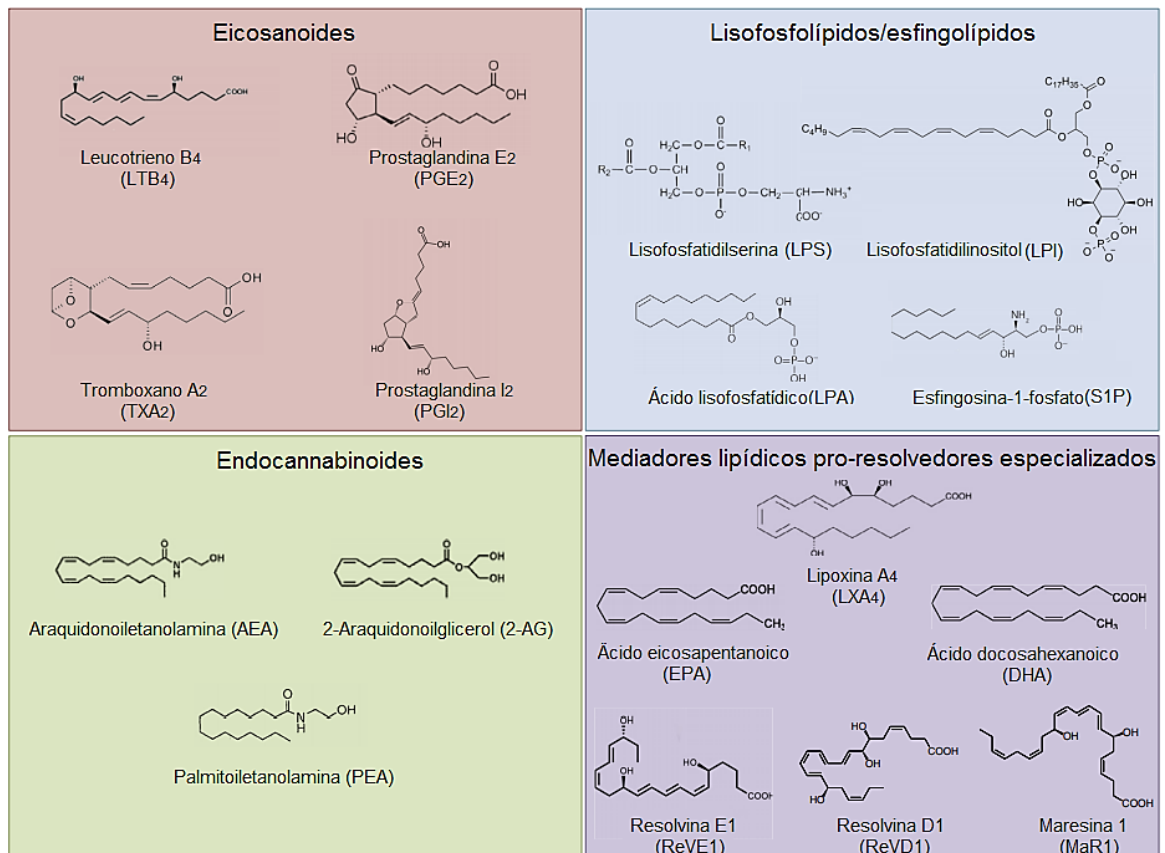


Figura 5. Clasificación de los lípidos bioactivos. Se muestran las clases de lípidos bioactivos con ejemplos de cada una: Eicosanoides, lisofosfolípidos/esfingolípidos, endocannabinoides y mediadores lipídicos pro-resolvedores especializados. Imagen modificada de Chiurchiú, y colaboradores.⁽⁴⁶⁾

1.3.2 Lisofosfolípidos/Esfingolípidos

El grupo de los lisofosfolípidos y esfingolípidos ha ganado importancia en los últimos años debido a sus recientes descubrimientos como reguladores fisiológicos. Este grupo de moléculas se caracteriza por contener fosfolípidos con una sola cadena acilada y está formado por muchos compuestos con un esqueleto de glicerol o esfingosina. ⁽⁴⁵⁾

Los que tienen esfingosina (2-amino-1,3—dihidroxi-octadec-4-eno), se conocen como esfingolípidos, como la ceramida y sus productos la ceramida-1-fosfato (C1P) y la esfingosina-1-fosfato (S1P). Por otro lado, los que contienen glicerol conforman el grupo de los lisofosfolípidos. ⁽⁴⁶⁾

Los lisofosfolípidos son compuestos lipídicos bioactivos que poseen una cadena de hidrocarburos de tamaño variable y un grupo polar en la cabeza de la estructura, dependiendo del grupo polar acoplado se clasifican en: Ácido fosfatídico (LPA), Liso-fosfatidilserina (LPSs), Liso-fosfatidilcolina (LPC), Liso-fosfatidilglicerol (LPG), Liso-fosfatidiletanolamina (LPE) y el Liso-fosfatidilinositol (LPI). ⁽⁴⁶⁾

1.3.2.1 Esfingosina-1-fosfato (S1P)

La S1P es un producto fosforilado de la esfingosina, considerada un producto dipolar hidrofóbico componente de la membrana plasmática. ⁽⁴⁷⁾ Su síntesis parte de la esfingosina derivada de la ceramida.

Las CCs, al igual que los eritrocitos, plaquetas, astrocitos, células endoteliales y células vasculares son células productoras de S1P. La S1P producida puede actuar intracelularmente o salir por medio de transportadores para actuar de forma autocrina o paracrina. En las CCs, el único transportador descrito es el transportador dependiente de ATP, ABCC1.

Una vez producida y liberada, la S1P circula unida a la lipoproteína HDL (60%) y a albúmina (30%), siendo la concentración en suero de 0.4-1.1 μM , en linfa de 100 nM, y en tejidos una concentración mucho más baja. ^(48,49)

La S1P participa en diferentes procesos fisiológicos como en el desarrollo del sistema cardiovascular, neuronal y de extremidades, en la regulación arterial y de vías aéreas, en el mantenimiento de la integridad endotelial, la recirculación de linfocitos, la reparación de heridas, en la protección neuronal y astrocítica, la hiperreactividad de las vías aéreas, la movilización de calcio de manera independiente del IP_3 ; aumenta el influjo del mismo a través de la corriente I_{Crac} y, finalmente, destaca su papel en la migración de diferentes componentes celulares, incluyendo células B y T, células NK, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, CCs y progenitores hematopoyéticos. ⁽⁵⁰⁻⁵⁶⁾

Tal es la importancia de la S1P en procesos de migración, que uno de los tratamientos más efectivos contra enfermedades como la esclerosis múltiple, está basado en el uso de un antagonista de sus receptores. El fingolimod (o FTY20), es un compuesto derivado del metabolito fúngico miriocina que, al entrar al organismo, es fosforilado convirtiéndose en FTY20-fosfato (p-FTY20). Este último compuesto antagoniza a los receptores de esfingosina (S1PRs), previniendo la migración leucocitaria y, por ende, la reacción inflamatoria generada por la misma. ⁽⁴⁸⁾ Debido al conocido papel que la S1P tiene en la inducción de la quimiotaxis de células del sistema inmune (incluyendo CCs), se considera que es un buen control positivo para el estudio de la migración celular de otros lípidos de este grupo.

Todas las funciones descritas para la S1P se llevan a cabo a través de sus receptores. Se reportan cinco receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), denominados S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 y S1PR5. ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾

En las CCs (ver Figura 6) está demostrada la expresión de tres de los cinco receptores, el S1PR1, el S1PR2, y el S1PR4. ^(50,57) El S1PR1 es el que está involucrado en la migración. El S1PR2 participa en el proceso de desgranulación, aunque de forma muy limitada, así como en la disminución de la motilidad. ⁽⁵⁵⁾ Las funciones del S1PR4 todavía no son claras, pero se sabe que participa en la regulación negativa de la desgranulación de CCs en

respuesta a la estimulación con IgE o la co-estimulación de IgE/antígeno e IL-33. ⁽⁶⁴⁾

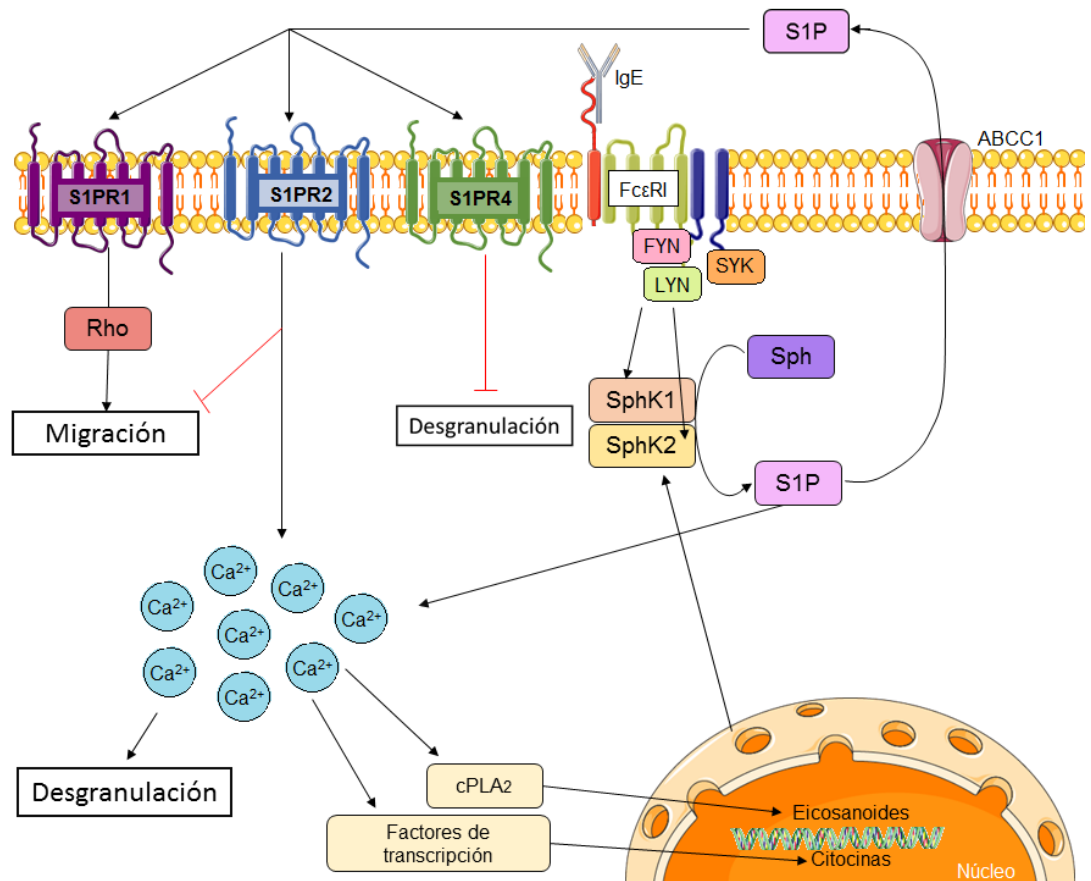


Figura 6. S1P y CCs. La estimulación del FcεR1 por la IgE induce vías de señalización que permiten la activación de las esfingosin-cinasas (SphK 1 y 2) que transforman esfingosina (Sph) a esfingosina-1-fosfato (S1P), la cual induce el flujo de calcio o bien sale a través del transportador ABCC1 para actuar sobre S1PR1, S1PR2 y S1PR4 para permitir la desgranulación, migración o bien la modulación de estas. Por su parte el calcio induce la síntesis de citocinas y eicosanoides. Imagen creada por Martínez-Aguilar, 2020.

1.3.2.2 α- Lisofosfatidilinositol (LPI)

El LPI es un lisofosfatidilinositol conformado por un esqueleto de glicerol y una cadena acil en la posición sn-1 o sn-2, así como un grupo de mioinositol en la cabeza de la estructura. ⁽⁶⁰⁾ Se reportan diferentes especies de este lípido dependiendo del ácido graso esterificado; el 50.5% contiene ácido esteárico, 22.1% contiene ácido araquidónico y el resto del porcentaje lo forman las especies que contienen ácido palmítico, oléico o palmitoleico. A pesar de que

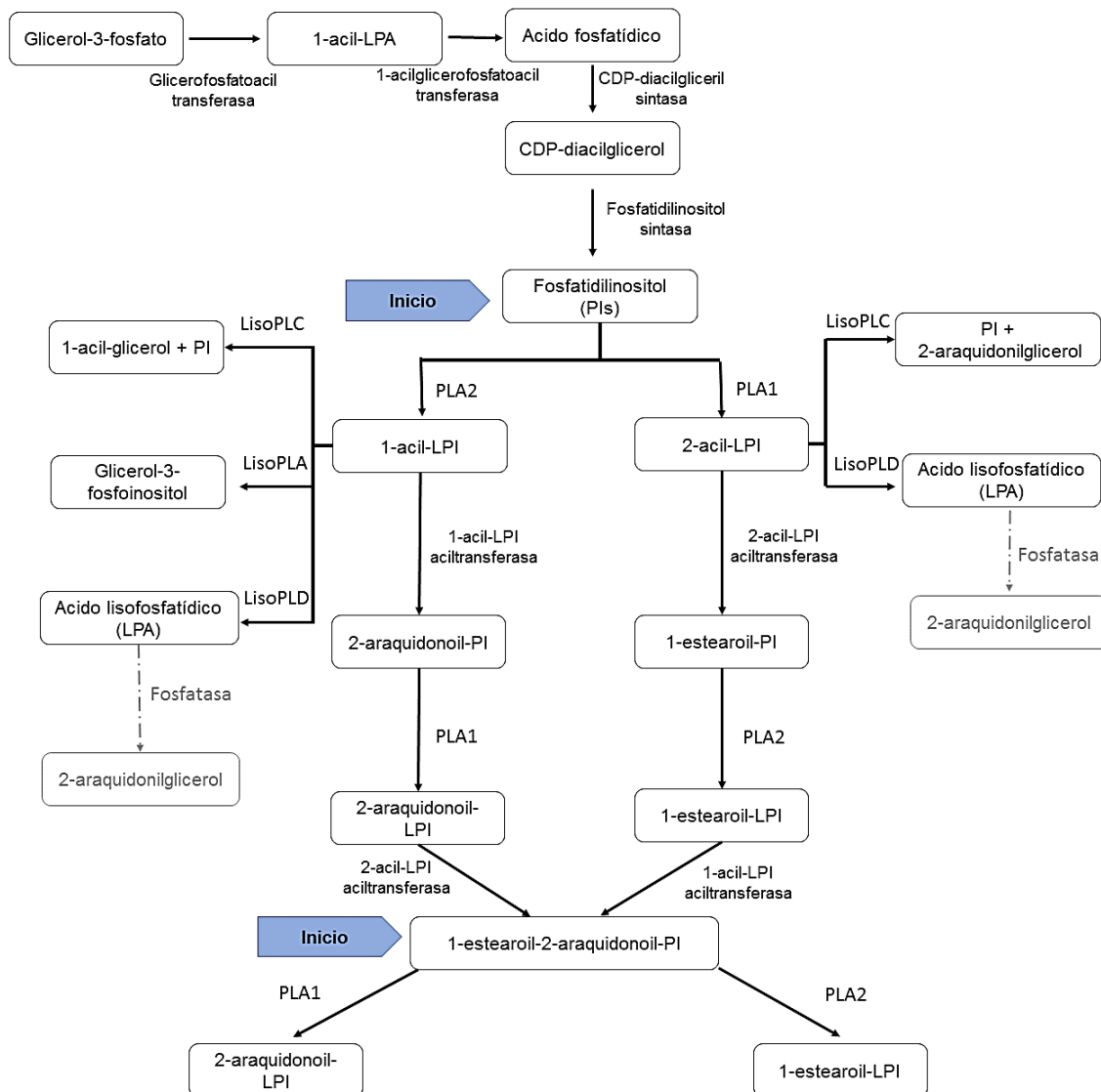
las especies que contienen ácido esteárico son las más abundantes, las especies con ácido araquidónico (2-araquidonil LPI) son 15 veces más afines por sus receptores que las especies de ácido esteárico (1-estearoil LPI).⁽⁶¹⁾

1.3.2.2.1 Síntesis y metabolismo

La síntesis y metabolismo del LPI es bastante compleja (ver Figura 7), puede partir de fosfatidilinositoles (PIs) ubicados en la membrana plasmática de síntesis *de novo* o bien del 1-estearoil-2-araquidonil-fosfatidilinositol que es un precursor más directo de las especies de LPI. Los fosfatidilinositoles se generan a partir de glicerol-3-fosfato. Una vez sintetizados, son hidrolizados por dos enzimas, la fosfolipasa A1 (PLA1) y la fosfolipasa A2 (PLA2). La PLA1 hidroliza ácidos grasos en la posición sn-1 dando como resultado 2-acil-LPI mientras que la PLA2 hidroliza a los PIs en la posición sn-2 formando 1-acil LPI. De aquí, tanto el 1-acil LPI como el 2-acil-LPI pueden transformarse gracias a enzimas como lisofosfolipasa C, D o A (lisoPLC, lisoPLD, lisoPLA), en otros compuestos como ácido lisofosfatídico (LPA), glicerol-3-fosfoinositol, 1-acil-glicerol o 2-araquidonilglicerol (2-AG). Este último compuesto es un elemento importante del sistema endocannabinoide.⁽⁶²⁾

Si el 1-acil-LPI y el 2-acyl-LPI no son transformados a ninguno de los componentes antes mencionados, entonces se convertirán en 2-araquidonil-LPI o 1-estearoil-LPI, respectivamente. A partir de estas especies de LPI, se genera el precursor más directo de los lisofosfatidilinositoles, el 1-estearoil-2-araquidonil-fosfatidilinositol. Este precursor es el más abundante en la membrana plasmática y normalmente sobre éste actúan las enzimas PLA1 y PLA2 generando 2-araquidonil-LPI o 1-estearoil-LPI respectivamente.⁽⁶²⁾

En la línea celular PC-3, de cáncer de próstata, se encontró que el 45% del LPI formado, sale al medio mediante el transportador ABCC1 y esta salida permite al LPI actuar de forma autocrina y/o paracrina.⁽⁶³⁾



Hasta la fecha, poco se sabe de células específicas productoras de LPI. En

Figura 7. Síntesis y metabolismo del LPI. Se detalla la síntesis de LPI, la cual puede iniciar de fosfatidilinositales (PIs) o 1-estearoil-2-araquidonil-PI, que sintetizan las dos subespecies más importantes de LPI: el 2-araquidonil-LPI y 1-estearoil-LPI. Sus metabolitos el 1-acil-LPI y 2-acil-LPI pueden sintetizar otros compuestos con la participación de la lisofosfolipasa C, D o A (lisoPLC, lisoPLD, lisoPLA), destacando la síntesis de 2-araquidonilglicerol (2-AG). Imagen modificada de Yamashita y colaboradores (2013).⁽⁶²⁾

células del sistema inmune, la única evidencia sobre la síntesis de LPI proviene de Masquelier y colaboradores (2018),⁽⁶⁸⁾ quienes demostraron que una línea de los macrófagos murinos (J774) tiene las enzimas necesarias para sintetizar y metabolizar LPI, concluyendo que este tipo de línea celular es productora de este lípido. Por otro lado, se reporta un aumento en los niveles de LPI plasmático en pacientes con cáncer de colon, próstata, mama u ovario.⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

Esto lleva a pensar que las células transformadas también pueden producir LPI. Sus concentraciones fisiológicas están determinadas únicamente en mujeres sanas, con un promedio de 0-1.5 μM en plasma. ⁽⁶⁷⁾

1.3.2.2.2 El LPI como un posible HAMP

Existe evidencia experimental que indica que el LPI puede ser considerado un DAMP condicional o HAMP. Por ejemplo, está demostrado un aumento en su concentración en varios estados patológicos, comparando las concentraciones fisiológicas del LPI con las producidas en sujetos enfermos, con padecimientos como infarto agudo al miocardio o el síndrome coronario agudo, obesidad o diabetes ⁽⁶⁹⁾ y cáncer de ovario. ⁽⁷⁰⁾ Estos hallazgos llevaron a proponer al LPI como un posible biomarcador temprano de tales patologías.

El efecto del LPI sobre el proceso de migración celular en diversos tipos celulares ha sido reportado principalmente en células transformadas, como en modelos de cáncer de mama, próstata y colon, donde el LPI lleva a la formación de filopodios y potencia la polarización y migración celular, lo que resulta en aumento de metástasis. ^(63-68 y 71) Poco se sabe sobre sus efectos en células del sistema inmune. Uno de los dos antecedentes que existe es el de Balenga y colaboradores (2011),⁽⁷²⁾ quienes demostraron que el LPI induce la migración y la polarización de neutrófilos, generando cambios importantes en su citoesqueleto de actina. Sin embargo, falta información sobre otras líneas celulares del sistema inmune innato, como las CCs.

1.4 RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNAS G 55 (GPR55)

1.4.1 Proteínas G_{12/13}

Los receptores acoplados a proteínas G son receptores transmembranales expresados ampliamente en los diferentes tejidos, controlando diversos procesos fisiológicos. En la actualidad se sabe que se encuentran codificados en 800 genes y existen aproximadamente 850 miembros. ⁽⁷³⁾ Son estructuras complejas, con 7 dominios transmembranales helicoidales, 3 asas extracelulares y 3 asas intracelulares, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular. Tienen diferentes ligandos como hormonas, neurotransmisores, agentes paracrinos, fotones, odorantes y saborizantes. ⁽⁷⁴⁾ Una vez activados, se acoplan a diferentes proteínas G heterotriméricas, que están conformadas por una subunidad α , una subunidad β y una subunidad γ . La subunidad α señala independientemente, mientras que las subunidades β y γ forman heterodímeros que tienen funciones regulatorias, así como de señalización. ⁽⁷³⁾

De estas subunidades, la α es la que permite clasificar a las distintas proteínas G, existiendo 4 familias: la G_s, G_i, G_{q/11} y G_{12/13}. La menos conocida de todas es la familia de G_{12/13}.

Las proteínas G₁₂ y G₁₃ (denominadas en conjunto G_{12/13}) fueron identificadas en 1991. ⁽⁷⁴⁾ Ambas formas se expresan ubicuamente, siendo activadas de forma simultánea por la mayoría de sus ligandos. Algunos de los ligandos descritos de estas proteínas son la angiotensina II, la endotelina, la trombina, el tromboxano 2 A, S1P o LPA. ⁽⁷⁵⁾

Las proteínas G_{12/13} activan a la GTPasa pequeña RhoA que, como ya vimos en capítulos anteriores (ver capítulo de migración celular), regula el citoesqueleto de actina, la forma celular, la polaridad, la migración, la transcripción de genes, vías de transporte y el crecimiento celular.

1.4.2 Generalidades GPR55

El GPR55 fue aislado y clonado por primera vez por Sawzdargo y colaboradores en 1999. ⁽⁷⁶⁾ El GPR55 es miembro de la familia de receptores purinérgicos o de quimiocinas. ⁽⁷⁷⁾ El gen del GPR55 humano fue mapeado en el cromosoma 2q17 y la proteína se expresa principalmente en el Sistema Nervioso Central (SNC), en los núcleos caudado y putamen, hipocampo, tálamo, puente de Varolio, cerebelo, corteza frontal e hipotálamo. En la periferia, se localiza en glándula adrenal, ganglio de la raíz dorsal, células endoteliales, en linfocitos, hígado, pulmón, útero, vejiga, riñón, hueso, bazo, islotes de Langerhans, yeyuno, íleon y estómago. ^(76, 78)

Se reportan diferentes ligandos del GPR55 que se comportan como agonistas sesgados, esto debido a sus enigmáticas características farmacológicas. El término agonismo sesgado hace referencia a la capacidad de un agonista para dirigir la señalización del receptor a través de una vía u otra, ⁽⁷⁹⁾ es decir que la señalización del receptor será dependiente del ligando. El LPI se une a un residuo en el bolsillo de unión dentro del dominio transmembranal 2 del GPR55 a través de su grupo polar y así inicia su activación. ⁽⁷⁶⁾

1.4.3 Señalización

Ryberg y colaboradores (2007)⁽⁷⁸⁾ demostraron que, a diferencia de los receptores clásicos a cannabinoides que están acoplados a la proteína Gi, el GPR55 está acoplado a las proteínas G_{12/13}. Adicionalmente, otros autores sugieren que también se encuentra acoplado a la proteína Gq. ⁽⁸⁰⁾

Actualmente, las vías mediadas por G_{12/13} y Gq son las mejor caracterizadas para el LPI. La activación de G₁₃ lleva a la activación de GTPasas como RhoA, Cdc42 y Rac1. ⁽⁹²⁾ Ya hemos descrito previamente las acciones derivadas de la activación de la GTPasa RhoA, la cual activa a ROCK. Sin embargo, la señal del LPI a partir de ROCK sigue dos caminos: uno que lleva a la fosforilación de la MAPK-ERK1/2 y otro que lleva a la fosforilación de LIMK. En la vía que conduce a la fosforilación de ERK 1/2, ROCK activa la vía de la fosfolipasa C (PLC γ y β), incrementando los

niveles de Ca^{2+} intracelular; donde el calcio activa diferentes isoformas de proteinas- cinasas C (PKCs), generando la fosforilación de ERK1/2 e iniciando olas de Ca^{2+} . La fosforilación de ERK1/2 activa factores de transcripción como NF κ B, ETV4 o CREB, siendo CREB y NF κ B los más activados por el LPI; por otro lado, el calcio lleva a la activación de NFAT, lo que permite regular la transcripción génica. (60, 81, 82) En la vía que regula al citoesqueleto, la fosforilación de la LIMK inhibe la fosforilación de la cofilina, promoviendo la acumulación de F-actina.

Por su parte, la proteína Gq estimula a la PLC, que conduce a la liberación de Ca^{2+} y a la activación de PKC, concluyendo en la fosforilación de ERK1/2. (60,83)

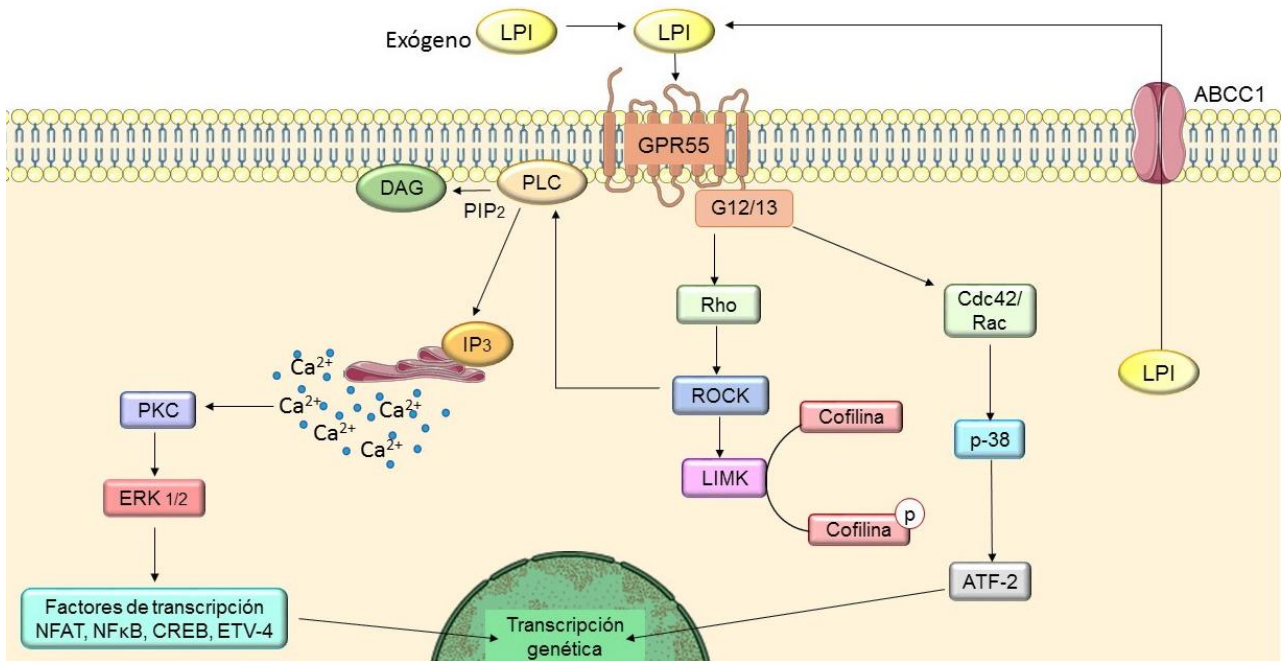


Figura 8. Vía de señalización del receptor GPR55. El LPI se une al GPR55 activando a la proteína $G_{12/13}$ que conduce a la fosforilación de RhoA/ROCK estimulando la fosforilación de cofilina mediada por LIMK y a la MAPK p-38. Adicionalmente el LPI induce la fosforilación de la MAPK ERK 1/2 la cuál estimula factores de transcripción. El LPI puede salir a través de su transportador ABCC1 y actuar de forma autocrina o paracrina. El LPI puede ser metabolizado a 2-AG activando a sus receptores CB₁ y CB₂. Finalmente, se muestra la posible dimerización entre el GPR55 y estos receptores. Imagen de autoría propia.

1.4.4 Funciones del LPI y el GPR55

Las funciones del LPI pueden depender de su principal receptor (GPR55), o bien, ser independientes de éste. Los efectos no mediados por su receptor se observan

principalmente sobre canales iónicos. El LPI puede activar a canales de K⁺ tipo TREK-1, TRAAK y b-Kv1.4k. ^(71,84) Estos canales se encuentran en el botón sináptico de neuronas, por lo que se sugiere que el LPI es un modulador de la función sináptica en el SNC. ⁽⁸⁵⁾ Del mismo modo, en células de la pituitaria, el LPI inhibe a las corrientes de Ca²⁺ dependientes de canales de calcio tipo L, ⁽⁸⁶⁾ mientras que en células neuroendocrinas regula el proceso de exocitosis de forma dependiente de calcio. ⁽⁸⁷⁾ En células endoteliales induce la movilización intracelular de Ca²⁺, generando cambios en el potencial de membrana. ⁽⁸⁸⁾ Por otro lado, se demostró que el LPI en la mitocondria induce la liberación de Ca²⁺ e inhibe su recaptura. ⁽⁸⁹⁾

La activación del GPR55 se asocia a diferentes procesos inflamatorios, agudos y crónicos. En procesos agudos se relaciona con patologías como la isquemia cardiaca, ⁽⁹⁰⁾ colitis ⁽⁹¹⁾ y neuroencefalitis, ⁽⁹²⁾ mientras que en procesos inflamatorios crónicos está asociado con obesidad ⁽⁶⁹⁾ y cáncer. ^(63,64,65,93)

1.4.5 Relación del binomio LPI/GPR55 con el sistema endocannabinoide

Existe una gran relación entre las vías activadas por el LPI a través del receptor GPR55 (LPI/GPR55) y el sistema endocannabinoide. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos. Desde el descubrimiento del GPR55, éste se proponía como un posible receptor tipo 3 del sistema endocannabinoide debido a la capacidad del GPR55 de reconocer ligandos clásicos de los receptores CB₁ y CB₂. ^(60,78) Aunque posteriormente se descartó debido a la baja homología en su secuencia de aminoácidos con los receptores CB₁ y CB₂, de tan sólo 13.5% y 14.4% respectivamente. ^(77, 94, 95)

Adicionalmente, como se mencionó en el apartado de síntesis y metabolismo del LPI, el metabolito 2-acil-LPI puede transformarse en 2-AG por la enzima lisoPLC. A su vez, el LPA formado del metabolismo del LPI también puede transformarse a 2-AG. Como consecuencia, el 2-AG producido por el metabolismo del LPI activará a los receptores CB₁ y/o CB₂.

Ligandos CB ₁ /CB ₂	CB ₁ /CB ₂	GPR55	EC ₅₀ o IC ₅₀ GPR55
Anandamida	Agonista	Agonista/ antagonista	EC ₅₀ =18nM IC ₅₀ =5.91μM
2-araquidonoilglicerol	Agonista	Agonista	EC ₅₀ =3nM
Δ ⁹ -THC	Agonista	Agonista	EC ₅₀ =8.1nM
Virodamina	Agonista	Agonista/ antagonista	EC ₅₀ =12nM IC ₅₀ =6.57μM
Éter de noladina	Agonista	Agonista	EC ₅₀ =10nM
Palmitoiletanolamida	Agonista	Agonista	EC ₅₀ =4nM
O-1602	Agonista (30μM)	Agonista	EC ₅₀ =1.4-13nM
AM251	Antagonista CB ₁	Agonista	EC ₅₀ =5.115μM
Cannabidiol	Agonista	Antagonista	IC ₅₀ =354nM
ML-193	Antagonista IC ₅₀ = 24.6μM (CB ₁) y 32μM (CB ₂)	Antagonista	IC ₅₀ =221nM

Tabla 2. Ligandos endocannabinoides y el GPR55. Se muestra la funcionalidad y potencia de agonistas y antagonistas cannabinoides sobre el sistema del GPR55. Δ⁹-Tetrahidrocannabinol (Δ⁹-THC).

La interacción entre los receptores también ha sido esclarecida. Como muchos otros GPCRs, se demostró que el GPR55 puede heterodimerizar con los receptores CB₁ y el CB₂ teniendo consecuencias funcionales. Se demostró la presencia de heterodímeros CB₁/GPR55 en SNC (en el tejido estriatal) ⁽⁹⁶⁾ y heterodímeros CB₂/GPR55 en células cancerosas de mama, neutrófilos y, posiblemente, en las CCs ha sido demostrada. ^(72, 97, 98) En todos los casos, la presencia del dímero y la activación de uno o los dos receptores generó cambios en la señalización. En el caso específico de los neutrófilos, el LPI indujo la migración de éstos, aunque el efecto aumentó cuando se co-estimuló con 2-AG.

La co-estimulación también inhibió la desgranulación y producción de especies reactivas de oxígeno.⁽⁷²⁾

La relación entre este grupo de receptores es muy evidente, por lo que, para estudiar alguno de los dos sistemas de receptores (GPR55 ó CBs) en los efectos del LPI, es necesario incluir la posible participación del otro.

2.- JUSTIFICACIÓN

La inflamación es un mecanismo de defensa contra condiciones y estímulos nocivos, sin embargo, si ésta no se resuelve en etapas tempranas, genera procesos inflamatorios de tipo crónico. Las patologías que cursan con inflamación tanto aguda como crónica han ido en aumento en las últimas décadas, representando un problema de salud pública a nivel mundial.

El sistema inmune innato es el regulador principal de los procesos inflamatorios, reclutando componentes celulares necesarios para el reconocimiento, mantenimiento y resolución de la inflamación; y una de las líneas celulares que participa activamente en etapas iniciales de la inflamación son las CCs.

Recientemente fue propuesto que un grupo de lípidos bioactivos, los lisofosfolípidos, son reguladores de procesos fisiológicos y patológicos, y son considerados ahora como DAMPs condicionales o HAMPs.

Debido a lo anterior, fue de interés para este proyecto investigar si el LPI pudiera ser considerado un HAMP para las CCs. Para este fin, se planteó conocer los efectos del LPI sobre las respuestas fisiológicas de las CCs y analizar si ese lípido bioactivo podría contribuir también al regreso a la homeostasis de las CCs inhibiendo la vía de señalización del receptor TLR4.

Entender estos mecanismos permitirá ampliar los pocos conocimientos que se tienen sobre los mecanismos de activación y silenciamiento de las CCs en la inmunidad innata, y, al ser el LPI un regulador potencialmente importante en procesos patológicos, permitirá generar conocimientos novedosos sobre nuevas líneas de tratamiento en procesos inflamatorios.

3.- HIPÓTESIS

El LPI se comportará como un HAMP en las CCs, al activar vías de señalización que llevan a la quimiotaxis y a la inhibición de la vía del receptor TLR-4 en ese tipo celular.

4.-OBJETIVOS

4.1-Objetivo general

Estudiar los efectos del α -Lisofosfatidilinositol (LPI) en las vías de señalización que llevan a la remodelación del citoesqueleto de actina y a la migración de las CCs, así como sus efectos sobre la activación del receptor TLR-4 en ese tipo celular.

4.2-Objetivos particulares

- Caracterizar la activación de la MAPK ERK1/2 por el LPI en las células cebadas.
- Investigar el posible papel quimioatrayente del LPI sobre las células cebadas, determinando la migración celular y la activación de proteínas clave en la vía de señalización que controla cambios en el citoesqueleto (LIMK y cofilina).
- Comparar los efectos del LPI en la señalización y migración con los efectos de la esfingosina-1-fosfato (S1P).
- Comparar los efectos del LPI con los del agonista selectivo del receptor GPR55, O-1602, en algunos parámetros de activación y quimiotaxis de las CCs.
- Analizar los efectos del antagonista selectivo del receptor GPR55 (ML-193 en algunos de los efectos observados con el LPI y el O-1602).
- Determinar el efecto del LPI sobre el sistema de transducción de señales del receptor TLR4.

5.-MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MÉTODOS

5.1.1 Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J (WT; No. de stock 000664 de Jackson Laboratories) de 4 a 6 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en instalaciones adecuadas, con control de temperatura (22-24°C) y humedad, en condiciones invertidas de ciclo luz/oscuridad (12:12h) y con acceso libre a agua y alimento. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cinvestav para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, protocolos no. 074-13 y 0137-13), siguiendo las reglas de la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062- ZOO-1999).

5.1.2 Generación de BMBCs

Se sacrificaron ratones C57BL/6J de aproximadamente 6-8 semanas de edad en una cámara de CO₂. Se disecaron ambas tibias y se extrajo la médula ósea de las mismas conforme al protocolo de Steffen K. Meurer 2016.⁽⁹⁹⁾ El canal medular se lavó rigurosamente por ambos extremos con 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA, cat. R4130-1L) suplementado con 20ng/mL de IL-3 (Preprotech, cat 213-13), 1x de aminoácidos no esenciales (NEAA 100x; Biofluids #332-100), 50µM de β-mercaptoetanol (SIGMA #M6250), 25 nM del buffer HEPES (1 M, pH 7.7; SIGMA #H7006), 10% de Suero Fetal Bovino (FBS,, GIBCO BRL cat. 261400779), 1mM de piruvato de sodio (stock 100mM, Biofluids #33-100), 1U/ de penicilina-0.1 mg/mL de estreptomina (Gibco #1378-016) y 1X de antimicótico (stock 100X Gibco #15240062). Los trozos de tejido recuperados con el líquido colectado fueron disociados y la suspensión celular se centrifugó por 5 minutos a 450xg a 4°C. Después, el sobrenadante fue removido y el pellet celular se disolvió en 30 mL de medio en cajas de cultivo Nunc T-75. Finalmente, los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂ durante 4-6 semanas, con cambios de medio cada 7-8 días.

5.1.3 Ensayos de desgranulación

Para probar la funcionalidad de las CCs se evaluó la secreción de la enzima β -hexosaminidasa después de la estimulación del receptor Fc ϵ RI como un parámetro para evaluar la capacidad de la célula de responder a LPI o S1P y llevar a cabo la liberación de sus mediadores inflamatorios.

Para cada ensayo, se utilizaron dos millones de células, las cuales fueron sensibilizadas con 100ng/mL de IgE monoclonal anti-dinitrofenol (DNP), clona SPE-7, por 24 horas a 37°C. Después de eso, se centrifugaron a temperatura ambiente 450xg por 4 minutos, se retiró el medio por decantación y se re-suspendió el botón en 1mL de buffer Tyrodes-BSA (20mM HEPES pH7.4, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucosa, 0.05% albúmina bovina BSA). A continuación, se estimularon con diferentes concentraciones LPI o S1P (1, 10, 100 y 1000 nM), como control positivo se utilizó un antígeno artificial de albúmina sérica humana acoplada a dinitrofenol (DNP-HSA, SIGMA cat. A6661), y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 4°C 450xg. En una placa de 96 pozos (para ELISA) se colocaron 60 μ L del sobrenadante y se adicionaron 40 μ L de p-nitrofenil-N-acetil- β -d-glucosaminida 1 mM (PNAG, de SIGMA). La placa fue incubada durante 1 hora a 37 °C. Al término de la incubación, se añadieron 120 μ L de solución Stop (Na₂CO₃ 0.1 M/Na₂HCO₃ 0.1 M) para detener la reacción. La reacción de la enzima β -hexosaminidasa con PNAG provoca la oxidación del paranitrofenol, generando un cambio en la coloración que es directamente proporcional a la actividad enzimática y que, por ende, dependerá de la cantidad de enzima presente. La liberación de β -hexosaminidasa fue cuantificada en un espectrofotómetro (Tecan Sunrise) a una longitud de onda de 405nm y el porcentaje de liberación se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Desgranulación} = (\text{D.O. de la muestra} \times 100) / \text{D.O. de la muestra control}$$

5.1.4 Western-Blot

En todos los experimentos, 2×10^6 BMBCs por condición fueron sensibilizadas con IgE 100ng/mL por 24 horas. Pasado ese lapso, las células fueron centrifugadas a temperatura ambiente a 420xg por 4 minutos, el medio fue decantado y las células re suspendidas en 1mL de Buffer Tyrodes BSA (20mM HEPES pH7.4, 135mM NaCl, 5mM KCl, 1.8 mM de CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5.6 mM glucosa, 0.05% albúmina bovina BSA).

Para estudiar los efectos fisiológicos del LPI se estudió la fosforilación de la MAPK ERK 1/2, LIMK y cofilina (ver Anexos V.I.II) con incubaciones a 37°C en diferentes tiempos (0, 5 10, 15, 30 y 60 minutos). Las células se incubaron con 10 nM y 100 nM de LPI, O-1602 o S1P, esta última como control. Todos los experimentos incluyeron sus respectivos controles positivos de DNP/HSA 27ng/mL; y controles negativos en condiciones sin estimular (basales), con vehículo DMSO (O-1602 o S1P) y en el caso del LPI, con una solución 27% metanol, 3% H_2O y 70% cloroformo.

Para estudiar los efectos del LPI (10nM) sobre proteínas de la vía canónica del TLR-4, se analizó la fosforilación de diferentes proteínas: ERK1/2, JNK, p-38, TAK-1, IKK y p-65. (ver Anexos V.I.II). Se utilizaron diferentes condiciones que abarcaron: Basal, Vehículo, LPS (100ng/mL), Vehículo+LPS, LPI (10nm) y LPI+LPS. En los casos donde se colocaron dos estímulos, se realizó una pre-incubación de 30 minutos a 37°C para el estímulo 1 y posteriormente se continuó con una incubación de 37°C por 30 minutos para el estímulo 2. Los estímulos solos se incubaron por 30 minutos a 37°C.

El Western-Blot se realizó utilizando un gel de acrilamida- SDS al 10%, 12% o 16%. Por lo general, el gel resolvidor fue preparado mezclando 6.14 mL de agua desionizada, 5 mL de 30% de acrilamida/Bis, 3.76 mL de 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 150 μL de 10% SDS y 50 μL de persulfato de amonio, APS, al 10%). La cantidad de la mezcla de acrilamida/bisacrilamida varió dependiendo de la concentración final del gel resolvidor. El gel concentrador fue preparado mezclando 1.425 mL de agua bidestilada, 425 μL de 30% de acrilamida/Bis, 625 μL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 25 μL de 10% SDS y 12.5 μL de 10% de APS). Los tubos con los extractos fueron

puestos en baño María a punto de ebullición por 2 minutos, se centrifugaron las muestras y se cargaron en el gel. De todas las muestras se cargó un total de 20 μ L. El gel corrió a 110V por un total de 2:30 o 3:00 horas. Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de PVDF (PerkinElmer, Polyscreen NEF1002001PK) utilizando una cámara de transferencia semi-húmeda a 20V por 30 minutos por gel. En el caso de las membranas en donde se evaluaría p-cofilina únicamente se transfirieron 15 minutos. Al finalizar la transferencia, la membrana se bloqueó durante dos horas con leche descremada (Svelty de Nestlé) al 5% en Tris adicionado con 0.1% de Tween (TBS-T). La membrana fue lavada e incubada con el anticuerpo específico de cada experimento (p-ERK 1:20,000, cofilina 1:3,000, LIMK 1:5,000, β -actina 1:15,000, JNK 1:5000, p-38 1:20,000, p-65 1: 5000, TAK1 1:5000 e IKK:1:5000) toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados a la membrana con TBS-Tween 1X de 10 minutos cada uno y se incubó con el anticuerpo secundario anti-Rabbit (1:15,000) o anti-Mouse (1:15,000) por una hora. Después de ese tiempo, nuevamente se realizaron tres lavados de 10 minutos y se continuó con la detección de la proteína utilizando soluciones para la reacción de quimioluminiscencia (BM Chemiluminiscense Western Blotting Mouse/Rabbit de Roche #1152070901). Las membranas fueron expuestas a placas de rayos X de KODAK. La cuantificación de las bandas (blots), se realizó mediante el análisis de densitometría utilizando el programa Image Studio (LI-COR Biosciences).

5.1.5 Inmunofluorescencia

Para evaluar los efectos del LPI sobre los cambios en el AAC de las BMMCs, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Para cada ensayo, se utilizaron 2×10^6 BMMCs, las cuales se trataron con LPI (10 nM) incubadas a 37°C en diferentes tiempos (15, 30, 60 y 120 minutos). Se usó como control a la S1P (100 nM) con 30 minutos de incubación. Una vez tratadas, se colocaron 200,000 BMMCs en un portaobjetos de cristal electrocargado por 15 minutos. Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% por 15 minutos y se lavó la laminilla en tres ocasiones con PBS 1X. A continuación, se agregó solución de bloqueo (PBS1X 919 μ L, BSA al 10% 30 μ L, Suero de burro 50 μ L y Tween-20 1 μ L). Una vez

bloqueada la laminilla se dejó incubando con Faloidina acoplada a Rodamina (1:750) durante toda la noche. Al día siguiente se lavó la laminilla por 5 ocasiones con PBS 1X y se trataron las células con 4´6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:750) por 5 minutos. Al finalizar, se lavaron nuevamente las células por 5 ocasiones y se añadió DABCO para sellar la preparación. Las células fueron analizadas por microscopia confocal utilizando el microscopio Carl-Zeiss LSM780 con el objetivo 63x.

5.1.6 Ensayos de migración en la cámara de Boyden

Se utilizaron 2×10^6 de BMMCs, las cuales fueron sensibilizadas con IgE 100 ng/mL 24 horas antes. Se utilizó una cámara de Boyden de 48 pozos (Neuro Probe, Gaithersburg, MD), con filtros de policarbonato de 25x80 mm con poros de 8µm. Los filtros se cubrieron con gelatina bovina (Sigma-Aldrich) al 2% (0.2 g de gelatina en 10 mL de agua MilliQ incubada a 37 °C) durante 2 horas y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las células se lavaron del medio RPMI con PBS 1X en dos ocasiones con centrifugaciones de 450xg por tres minutos, posteriormente se trataron con calceína-AM (1 µg/µL) por 1 hora a 37°C en condiciones de oscuridad, transcurrido ese tiempo se lavaron tres veces más con PBS 1X. Finalizando los lavados, las células fueron re suspendidas en 2 mL de medio de migración (1.64 g de medio (para 100 mL), 80 mL de agua bidestilada y desionizada, 0.2% de NaHCO₃). Los pozos de la cámara inferior fueron llenados con un volumen de 30 µL de diferentes soluciones, en el caso del control únicamente se colocó medio de migración, para nuestros pozos problema se colocaron diferentes soluciones, dependiendo del experimento. Primero, se realizaron curvas concentración-respuesta al LPI (10 nM, 100 nM y 1 µM), O-1602 (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM), S1P (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM) y ML-193 (16 nM, 40 nM, 100 nM, 251 nM y 631 nM). En el caso de los experimentos con el ML-193, se hizo una incubación previa por 15 minutos a 37°C y en los pozos inferiores de la cámara se cargaron 30 µL de O-1602 (100 nM). Una vez cargados los pozos inferiores, se colocó la membrana gelatinizada, evitando generar burbujas de aire y se procedió a cargar los pozos superiores, colocando 50 µL de la suspensión de las BMMCs en cada pozo (40, 000

BMMCs). La cámara se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Concluido ese tiempo la membrana se fijó con metanol durante 15 minutos y, una vez seca, se colocó en un portaobjetos electrocargado y fue analizada en el microscopio de epifluorescencia con el objetivo 20X. La cuantificación de células por campo se realizó en cuatro campos diferentes tomados al azar con ayuda del software ImageJ (Java, 2019) y se realizó un promedio de éstas.

5.1.7 RT-PCR

Para estudiar los efectos del LPI (10 nM) sobre la producción de citocinas inducidas por el LPS, se analizó la síntesis del mRNA de diferentes citocinas: IL-4, IL-2, IL-6, TNF- α , TGF- β , CCL-2 y VEGF (ver Anexos V.I.III).

Para sintetizar el cDNA se utilizó un kit comercial (Thermo Fisher Scientific). Se preparó una reacción inicial que contenía 1 μ L de oligo(dT), 1 μ g de RNA y se aforó con agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) hasta obtener 12 μ L. La mezcla se centrifugó brevemente y se incubó a 65°C por 5 minutos. Terminada la incubación se preparó otra reacción que contenía 4 μ L de 5X Buffer de reacción, 1 μ L de RiboLock RNase inhibitor (20 u/ μ L), 2 μ L del mix de dNTP 10 nM, 1 μ L de RevetAid Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ μ L) para un volumen total de 20 μ L, el cual se añadió a la reacción previa. Esta reacción fue incubada a 42°C durante 60 minutos. Posterior a esta incubación se detuvo la reacción mediante una incubación a 70°C durante 10 minutos. Finalmente, se añadieron 130 μ L de H₂O tratada con DEPC para obtener un volumen final de 150 μ L del templado.

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Thermo Fisher Scientific), se preparó una mezcla que contenía 2.5 μ L de 10X PCR buffer con MgCl₂, 0.5 μ L de dNTP Mix 10mM, 0.2 μ L de Taq polimerasa (5 u/ μ L) y 17 μ L de DEPC/Water. Al Mix se le agregaron 3.2 μ L de cDNA, más 1 μ L de cada primer. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 95 °C por 10 minutos; 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 45 segundos y un paso final de 72 °C por 7 minutos realizándose diferentes ciclos para cada citocina. Finalizada la PCR los productos fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa-TBE al 2% y teñido con

bromuro de etidio. Las imágenes del gel se obtuvieron utilizando MiniBis Pro from BioImaging Systems.

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se generaron CCs derivadas de médula ósea (BMMCs) de ratones C57BL/6J, utilizando protocolos ya estandarizados. ⁽⁹⁹⁾ Para todos los experimentos, las BMMCs fueron sensibilizadas por 24 horas con una inmunoglobulina E (IgE) monoclonal anti dinitro-fenol (DNP), ya que esta incubación aumenta el contenido de mediadores pro-inflamatorios en este tipo celular. ⁽¹⁰⁰⁾ Para evaluar los efectos del LPI sobre la funcionalidad de las BMMCs se realizaron ensayos de desgranulación, utilizando diferentes concentraciones de LPI (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M y 10 μ M) con 30 minutos de incubación a 37°C. Como control se utilizó a la S1P, en las mismas concentraciones, ya que sus efectos ya se conocen en este tipo celular.

Para determinar los efectos del LPI sobre la vía clásica de transducción de señales del GPR55 se analizó la fosforilación de ERK1/2, la cual ya ha sido descrita en otros modelos celulares. Se realizaron cursos de fosforilación (0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos) con 10 nM y 100 nM de LPI, y para corroborar que los efectos eran mediados por el GPR55, se usó al agonista selectivo O-1602, en las mismas concentraciones y tiempos que el LPI. Los cambios en fosforilación de proteínas activadas clásicamente por el receptor GPR55 involucradas en migración, como la proteína LIMK y la cofilina, se estudiaron siguiendo los mismos cursos temporales y concentraciones, utilizando al LPI, el O-1602 y se agregó como control a la S1P. Para todos los experimentos se utilizaron controles negativos (sin estimular y vehículo) y controles positivos con IgE/DNP-HSA de 100 ng/mL en 30 minutos de incubación.

Para evaluar los cambios en el citoesqueleto de actina cortical de las BMMCs, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con faloidina (una micotoxina selectiva para F-actina) acoplada a rodamina (1:750). Las preparaciones se visualizaron en

un microscopio confocal Zeiss, modelo LSM 800, con un objetivo de 63x. La polarización de las células se determinó observando estructuras propias de la polarización como formación de prolongaciones, el aumento en el diámetro celular, el aplanamiento de las células y la localización del núcleo. Además, se analizó el perfil de distribución de la rodamina en cuatro campos diferentes por condición.

Para estudiar el posible efecto quimioatrayente del LPI sobre las células cebadas se utilizó la técnica modificada de la Cámara de Boyden.⁽¹⁰¹⁾ Se utilizaron 1×10^6 BMBCs, que se incubaron por una hora con calceína ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) a 37°C . Además del LPI, se utilizó 1) el agonista sintético del GPR55, O-1602; 2) la esfingosina 1-fosfato, S1P; y 3) el antagonista del GPR55, ML-193. Como control negativo se utilizó medio sin suero fetal bovino (FBS), mientras que como control positivo se utilizó medio con FBS. En los pozos superiores se colocaron 40,000 células por condición. La cámara se incubó por 3 horas a 37° y, posteriormente, se observó la membrana en un microscopio de epifluorescencia, con un objetivo 20x. La cuantificación de fluorescencia se realizó con el software ImageJ en 4 campos diferentes por condición.

Finalmente, para determinar el efecto del LPI (10 nM) sobre el sistema de transducción de señales del receptor TLR4, se evaluó la fosforilación de proteínas clásicas de la vía del TLR4 en presencia del LPI. Las proteínas analizadas fueron ERK1/2, p-38, JNK, TAK-1, JNK y p-65 en su forma fosforilada (activa) por Western Blot. Adicionalmente, se estudiaron los efectos del LPI sobre la síntesis del mRNA de citocinas inducidas por la activación de TLR4 como IL-4, IL-2, IL-6, TNF- α , TGF- β , CCL-2 y VEGF mediante la técnica de RT-PCR.

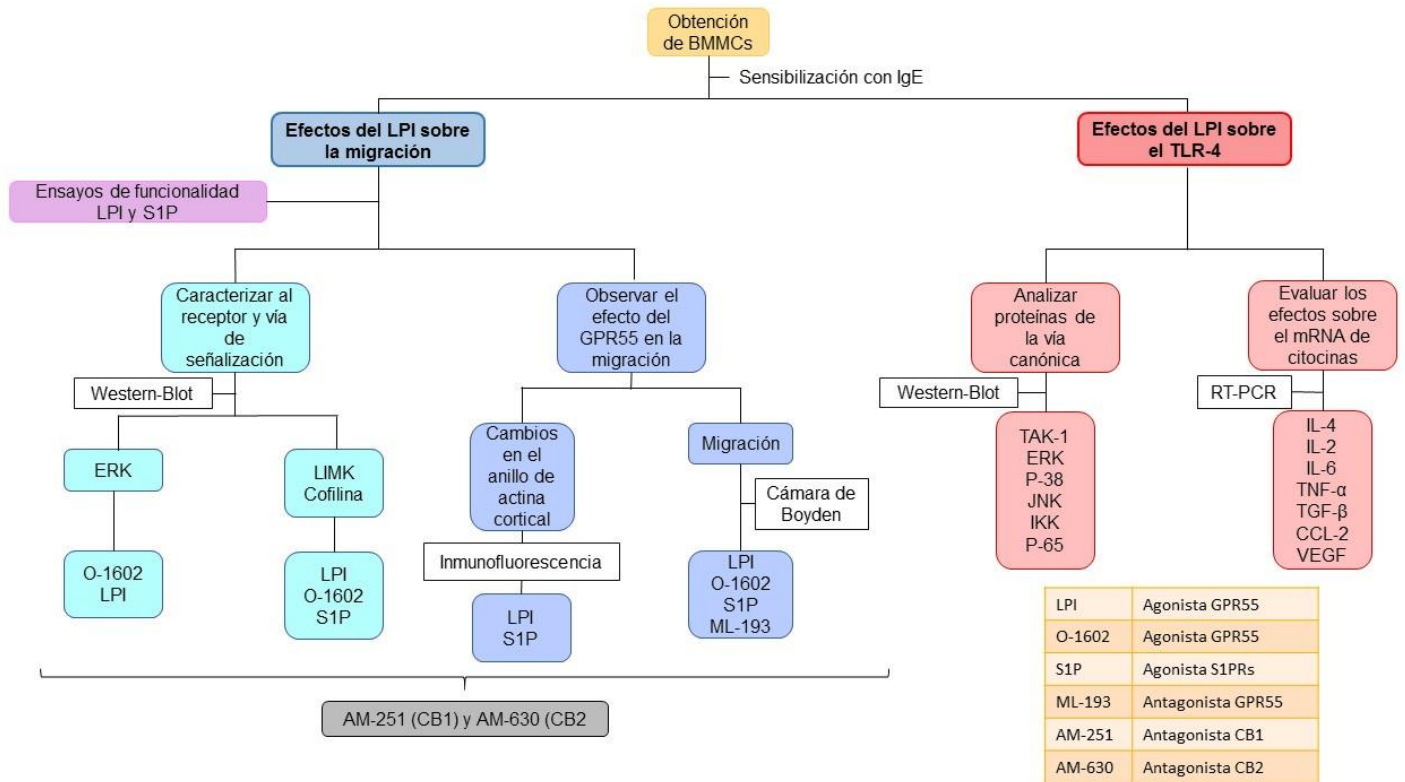


Figura 9. Mapa conceptual del diseño experimental. En tonalidad azul se muestran los experimentos que analizaron las funciones fisiológicas del LPI (fosforilación de ERK 1/2 y migración), mientras que en tonalidad roja se encuentran los efectos del LPI en procesos patológicos (sobre la vía del TLR-4).

6.-RESULTADOS

6.1 EFECTO DEL LPI SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LAS CCs

Para determinar los efectos del LPI sobre la funcionalidad de las CCs se realizaron ensayos de desgranulación cuantificando la liberación de la enzima β -hexosaminidasa. Como control, se compararon los efectos del LPI con los producidos por la S1P, otro lípido bioactivo cuyas funciones ya se conocen en las CCs. Se utilizaron diferentes concentraciones de ambos lípidos, las cuales fueron 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM, utilizando como control positivo al antígeno DNP-HSA (27 ng/mL).

En la Figura 10, se observa que el antígeno provocó la desgranulación de las BMBCs en un 60-70%. La S1P no indujo la desgranulación con ninguna de las concentraciones probadas. Del mismo modo, el LPI tampoco indujo la desgranulación con ninguna de las concentraciones utilizadas. Aunque en algunos experimentos se observó un efecto del vehículo utilizado para disolver el LPI, éste no mostró una diferencia estadísticamente significativa con el basal.

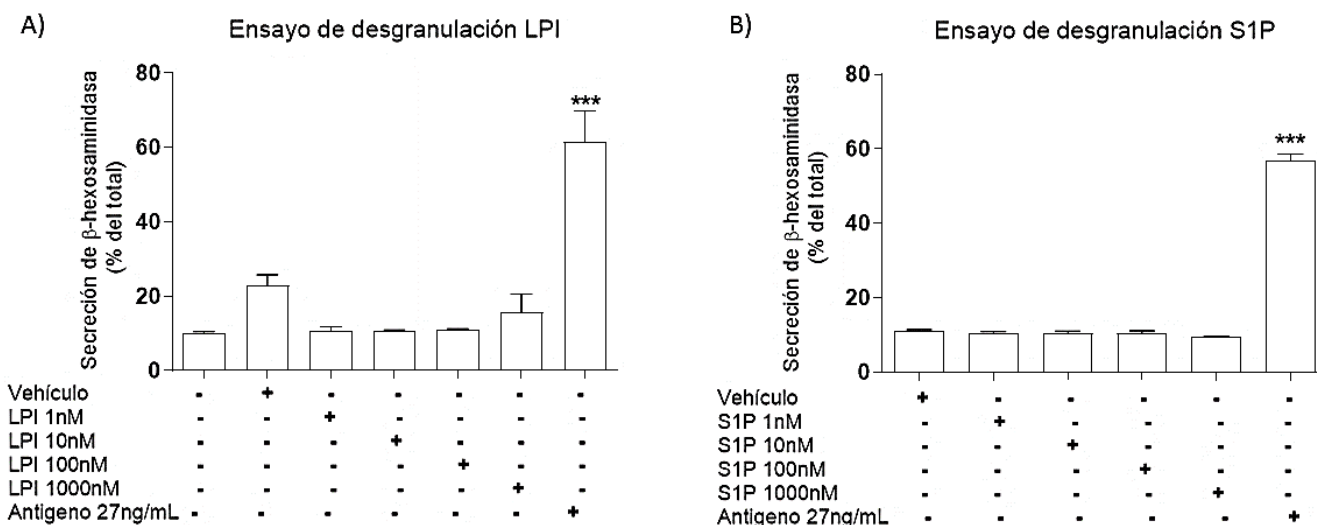


Figura 10. Efectos del LPI y la S1P sobre las CCs. Se utilizó un millón de CCs por condición. Las células fueron estimuladas con LPI y S1P a diferentes concentraciones (1, 10, 100, y 1000 nM) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se cuantificó la liberación de β -hexosaminidasa y se graficó el porcentaje de desgranulación. El análisis estadístico corresponde a 3-4 experimentos independientes determinado por un análisis de varianza de una vía, seguido de una prueba de Dunnett. * Diferencia significativa comparada con las condiciones basales ($p < 0.05$).

6.2 EFECTO DEL LPI SOBRE VÍAS ACTIVADAS POR EL GPR55

6.2.1 Análisis del LPI sobre la fosforilación de ERK1/2

Para conocer los efectos de LPI en las CCs, primero se corroboraron los efectos de ese lípido sobre la vía clásica del GPR55, evaluando la fosforilación de la MAPK ERK1/2. Así mismo, para corroborar que los efectos observados fueran dependientes de la activación del GPR55 se utilizó al agonista selectivo O-1602. Como control positivo se utilizó el antígeno a una concentración de 27ng/mL.

Se realizó un curso temporal (0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos) utilizando las concentraciones de 10nM y 100nM de LPI. El O-1602 se utilizó a las mismas concentraciones.

Los resultados con LPI (Figura 11) muestran que 10 nM y 100 nM de LPI inducen la fosforilación de ERK1/2 a los 10 minutos, sin embargo, la respuesta con 100nM a los 10 minutos es 30% mayor a la observada con 10 nM. Ambos datos son estadísticamente significativos (Anova de 1 vía seguida de una prueba Holm-Sidak($p < 0.05$)).

El O-1602 (10 nM) (Figura 12) induce la fosforilación de ERK1/2 a los 10 minutos, aumentando 4 veces su fosforilación respecto a los niveles basales, estos datos son muy similares a los observados con 100 nM de LPI. Por su parte, 100 nM de O-1602 induce la fosforilación de ERK1/2 a partir de los 10 minutos y se mantiene a lo largo del curso temporal con un máximo a los 15 minutos.

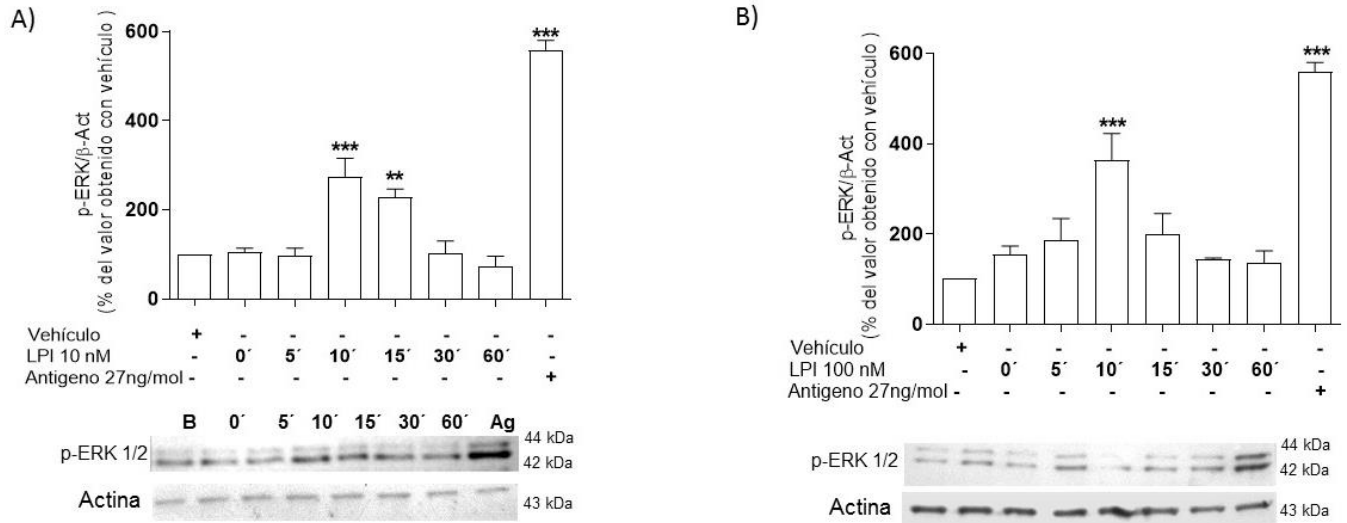


Figura 11. Curso temporal de fosforilación de ERK con LPI. Dos millones de células por condición fueron incubadas a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min) con 10 y 100 nM de LPI. Se observó el efecto del LPI sobre la fosforilación de la MAPK-ERK mediante la técnica de Western Blot. Western-Blot representativo de la concentración de 10nM (A) y 100nM (B) con las gráficas correspondientes a la densitometría realizada que muestran los valores del error estándar, así como las imágenes representativas. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes. Determinado por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Holm-Sidak. * Diferencia significativa comparada con las condiciones basales ($p < 0.05$).

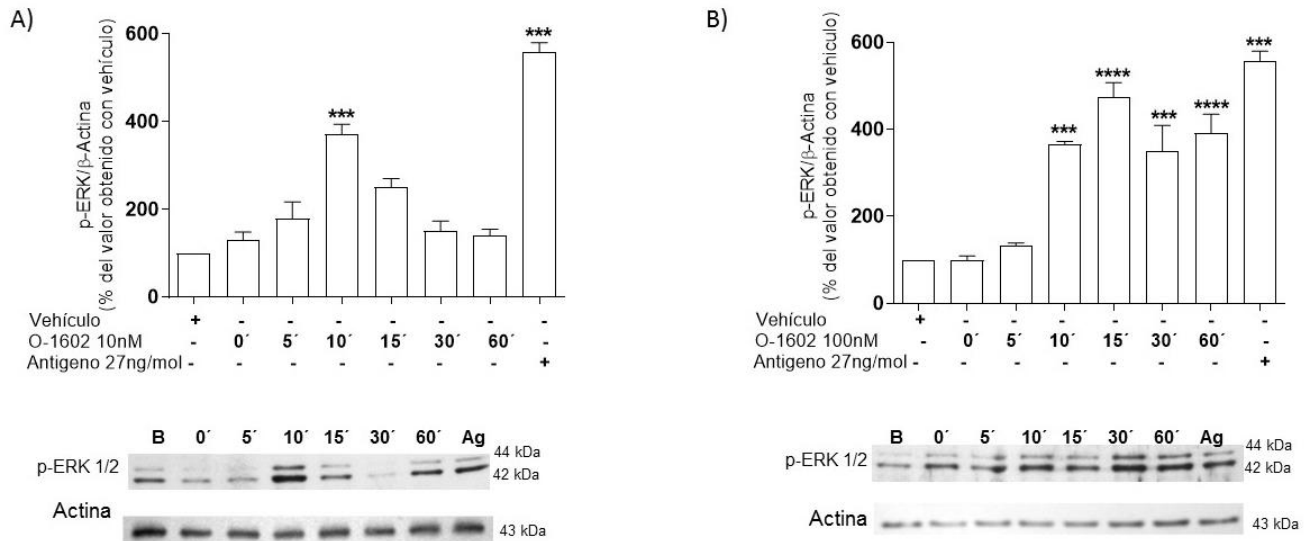


Figura 12. Curso temporal de fosforilación de ERK con O-1602. Dos millones de células por condición fueron incubadas a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 30 y 60 min.) con 10 y 100 nM de LPI. Se observó el efecto del LPI sobre la fosforilación de LIMK mediante la técnica de Western Blot. A) Western-Blot representativo de la concentración de 10nM con las gráficas correspondientes a la densitometría realizada que muestran los valores del error estándar. B) Western-Blot representativo de la concentración de 100nM con las gráficas correspondientes a la densitometría realizada que muestran los valores del error estándar. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes. Determinado por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Holm-Sidak (A) y Bonferroni (B). * Diferencia significativa comparada con las condiciones basales ($p < 0.05$).

6.2.2 Análisis del LPI sobre la fosforilación de proteínas que regulan al citoesqueleto de actina (LIMK y cofilina)

Con el fin de evaluar si el LPI (10 nM y 100 nM) activa vías de señalización que regulan el citoesqueleto de actina, se analizaron sus efectos sobre la fosforilación de las proteínas LIMK y cofilina. Para corroborar que los efectos eran determinados por la activación del GPR55, se utilizó al ligando sintético, O-1602. Como control positivo se evaluaron los cambios inducidos por la S1P. Tanto el O-1602 como la S1P se utilizaron a las mismas concentraciones que el LPI. Se realizaron cursos temporales con los tiempos ya descritos, usando al antígeno (27 ng/mL) como control positivo. En las tres condiciones (LPI, O-1602 y S1P), en las células tratadas con antígeno se observó la fosforilación de la LIMK y se detectó también la desfosforilación de cofilina.

El LPI (Figura 13), a la concentración de 10 nM indujo la fosforilación de LIMK hasta los 60 minutos, mientras que a 100nM indujo la fosforilación desde tiempos más tempranos, a los 10, 30 y 60 minutos. El curso temporal de fosforilación de cofilina se realizó únicamente con la concentración de 10 nM de LPI, observando fosforilación significativa a los 5, 30 y 60 minutos.

Para conocer la posible participación del GPR55 en la fosforilación de LIMK y cofilina por el LPI, se realizaron los experimentos mencionados con el LPI, pero utilizando al agonista selectivo O-1602 (Figura 14). El tratamiento con 10 nM de O-1602 produjo una fosforilación significativa de LIMK a los 60 minutos. Por otro lado, 100 nM de O-1602 indujo la fosforilación de LIMK desde los 15 hasta los 60 minutos, con un máximo en la fosforilación a los 30 minutos. El curso temporal de la desfosforilación de la cofilina se realizó únicamente con 10 nM de O-1602, en donde se observó un efecto significativo a los 60 minutos.

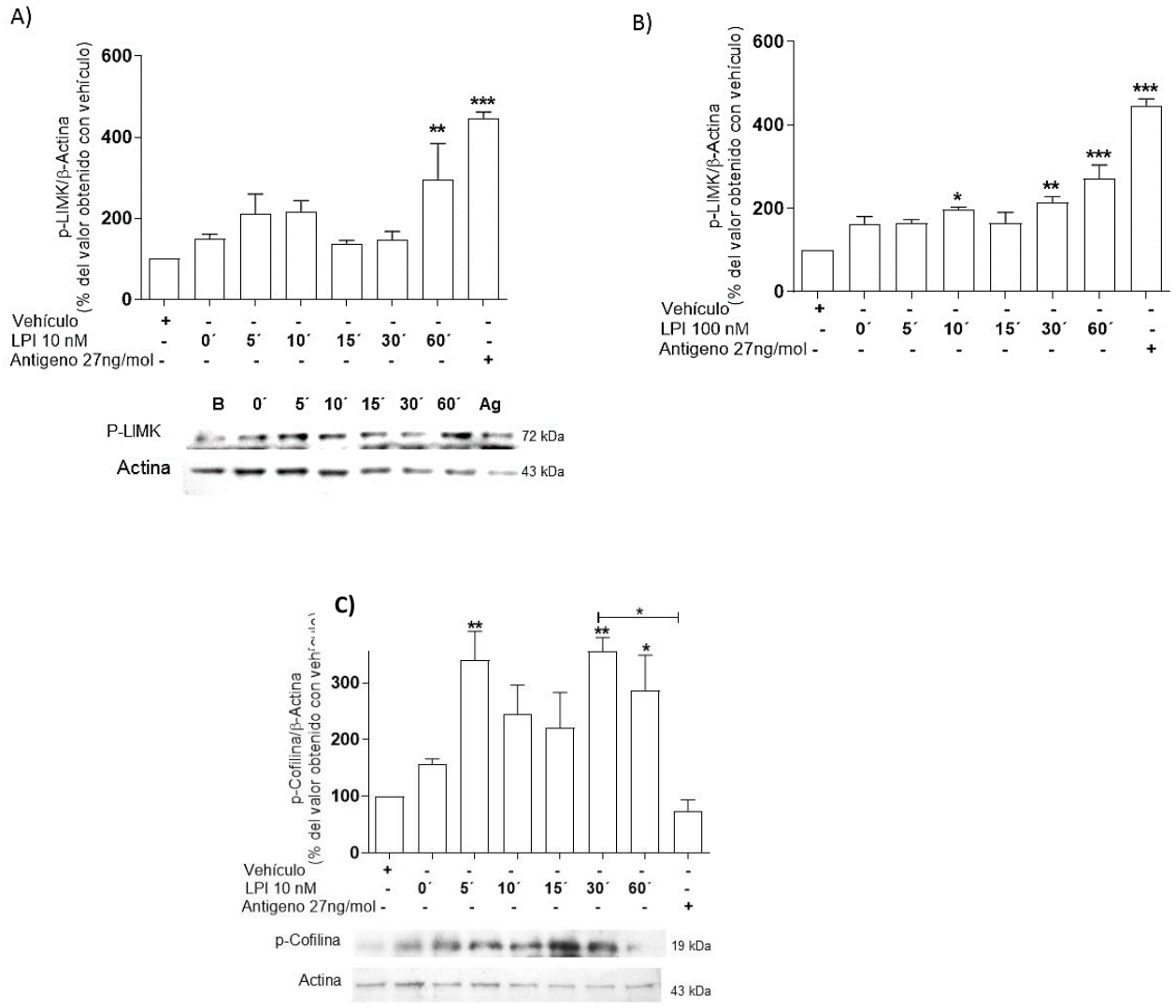


Figura 13. Curso temporal de fosforilación de LIMK y cofilina por LPI. 2×10^6 de células por condición fueron incubadas a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 30 y 60 min.) con 10 y 100 nM de LPI. Se observó el efecto del LPI sobre la fosforilación de LIMK y cofilina mediante la técnica de Western Blot. Se muestran las gráficas correspondientes a la densitometría que muestran los valores del error estándar, así como una imagen representativa. **A)** Western-Blot representativo de la concentración de 10 nM sobre la fosforilación de LIMK. **B)** Western-Blot representativo de la concentración de 100 nM sobre la fosforilación de LIMK. **C)** Western-Blot representativo de la concentración de 10 nM sobre la fosforilación de cofilina. Los resultados corresponden a 3-4 experimentos independientes. Determinado por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Holm-Sidak (A) y Bonferroni (B) y Tukey y Dunett (C). * Diferencia significativa comparada con las condiciones basales ($p < 0.05$).

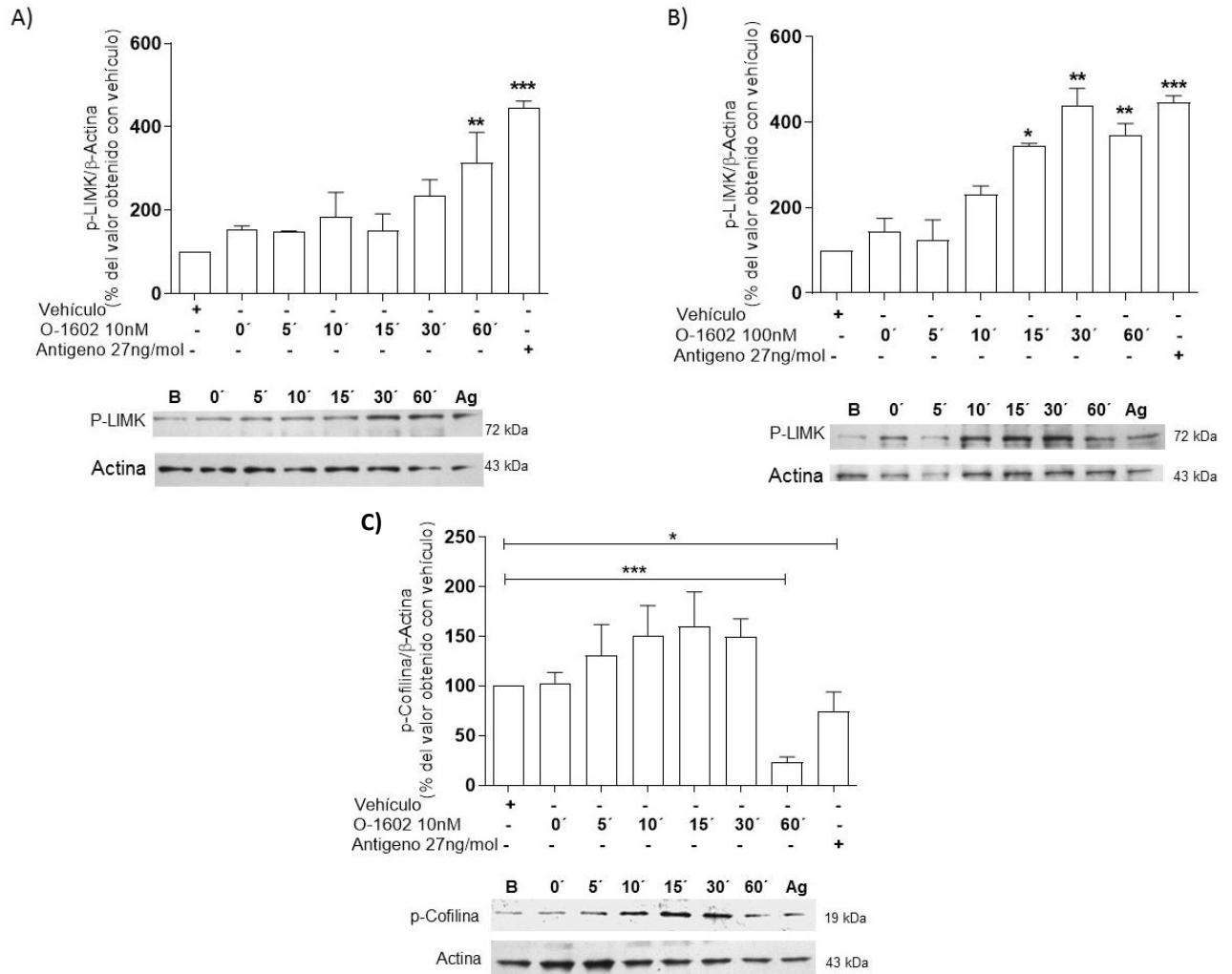
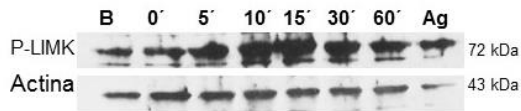
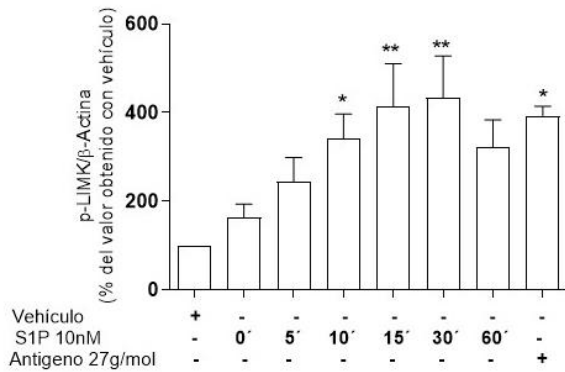


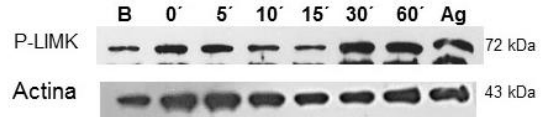
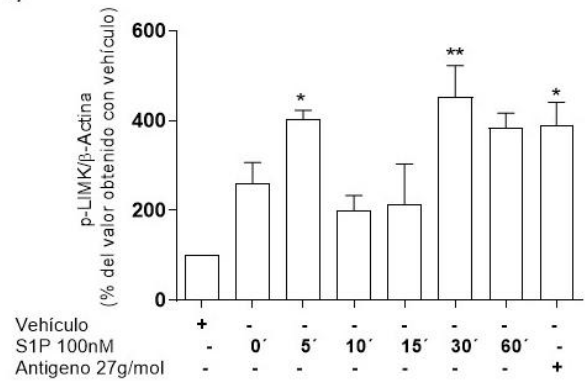
Figura 14. Curso temporal de fosforilación de LIMK y cofilina por O-1602. 2×10^6 células por condición fueron incubadas a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 30 y 60 min.) con 10 y 100 nM de O-1602. Se muestran las gráficas correspondientes a la densitometría que muestran los valores del error estándar, así como una imagen representativa. **A)** Western-Blot representativo de la concentración de 10 nM sobre la fosforilación de LIMK. **B)** Western-Blot representativo de la concentración de 100 nM sobre la fosforilación de LIMK. **C)** Western-Blot representativo de la concentración de 10 nM sobre la fosforilación de cofilina. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes. Determinado por un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Holm-Sidak (A y B) y de Dunnett y T-Student (C). * Diferencia significativa comparada con las condiciones basales ($p < 0.05$).

Para contrastar los cambios inducidos por la activación del GPR55 con un compuesto de efectos conocidos en BMMCs, se utilizó a la S1P. En la Figura 15 se muestran los resultados del curso temporal con 10 nM y 100 nM de S1P. Se observa que 10 nM de S1P induce la fosforilación de LIMK desde etapas tempranas, alcanzando el máximo a los 30 minutos, y mostrando una disminución a los 60 minutos. Cuando se utilizó 100 nM de S1P, si bien se observó una fosforilación (5 y 30 minutos), también se detectó una ola de fosforilación-desfosforilación rápida. La cofilina analizada únicamente en presencia de S1P (10 nM), se desfosforiló significativamente a los 30 minutos, sin embargo, sí se aprecia una disminución

A)

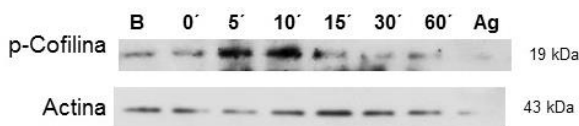
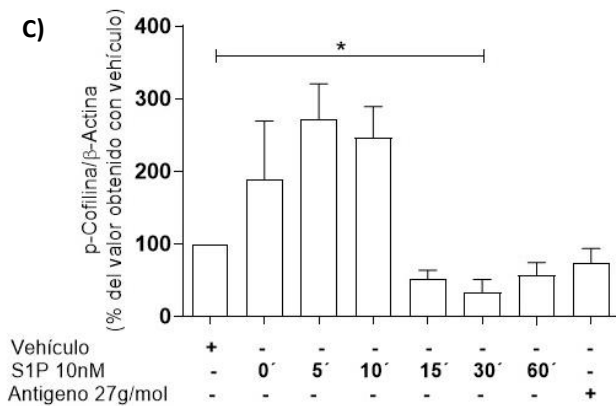


B)



desde los 15 minutos.

C)



($p < 0.05$).

Curso temporal de fosforilación de LIMK por S1P.

2x10⁶ células por condición fueron a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 30 y 60) 0 y 100 nM de S1P. Se muestran con las correspondientes a la densitometría que los valores del error estándar, así como una representativa. **A)** Western-Blot representativa de la concentración de 10 nM sobre la fosforilación de LIMK. **B)** Western-Blot representativa de la concentración de 100 nM sobre la fosforilación de LIMK. **C)** Western-Blot representativa de la concentración de 10 nM sobre la fosforilación de cofilina. Los resultados se muestran en la Figura 15. Los resultados se muestran en la Figura 15 en 3 experimentos independientes. Se realizó un análisis de varianza de una vía, con una prueba de Holm-Sidak. * Diferencia significativa comparada con las condiciones basales

6.3 DETERMINAR EL POSIBLE EFECTO QUIMIOATRAYENTE DEL LPI SOBRE LA CCS

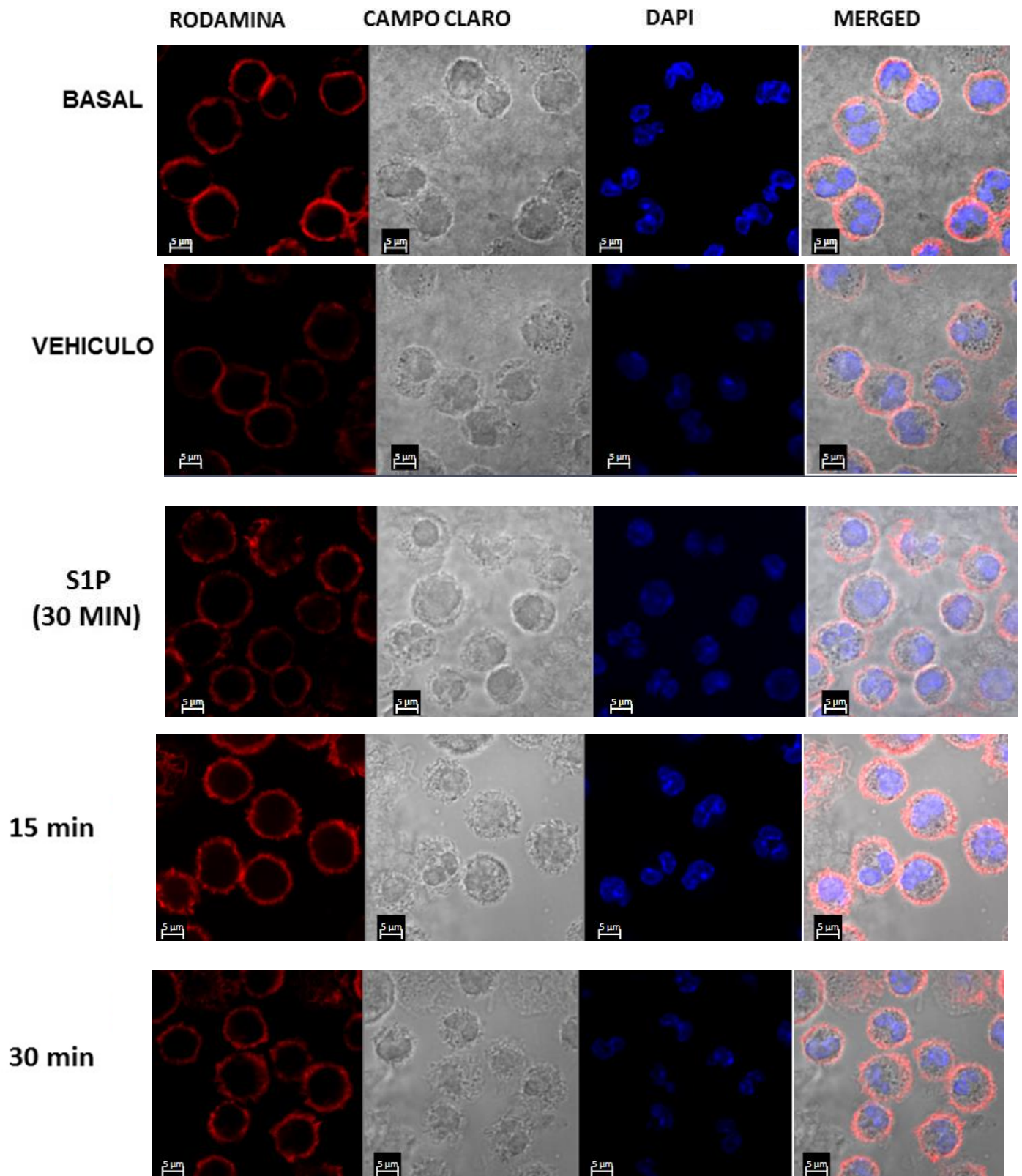
6.3.1 Evaluación del LPI en cambios del anillo de actina cortical.

Para evaluar los cambios en el anillo de actina cortical (AAC), se realizó un curso temporal de 15', 30', 60' y 120 minutos con un estímulo de 10 nM de LPI. La técnica que se utilizó fue inmunofluorescencia con faloidina acoplada a rodamina. Como control positivo se utilizó una incubación de 30 min con 100 nM de S1P.

Con la técnica utilizada, se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal del corte ecuatorial de las células. Así, el anillo de actina cortical se muestra en color rojo (rodamina) y el núcleo celular en azul (DAPI).

En la Figura 16 se muestran los resultados del experimento, en condiciones basales y con vehículo, el AAC se observó como una estructura delgada y bien delimitada con el núcleo localizado en la parte central de las células. En el control con S1P se aprecia engrosamiento del AAC, así como la formación de prolongaciones, un aumento en el diámetro celular y la movilización del núcleo hacia un extremo celular.

Los resultados con LPI muestran que a los 15 y 30 minutos hay engrosamiento del AAC, así como la presencia de prolongaciones cortas tipo espigas; cuando las imágenes se superponen, se observa el núcleo hacia un extremo disminuido en tamaño en comparación al basal. Después de 60 minutos de tratamiento con LPI se observa un aumento en el diámetro celular y un aplanamiento de la célula, con la desaparición de las prolongaciones. A los 120 minutos se aprecia heterogeneidad en la respuesta encontrando células similares a cada una de las condiciones previas.



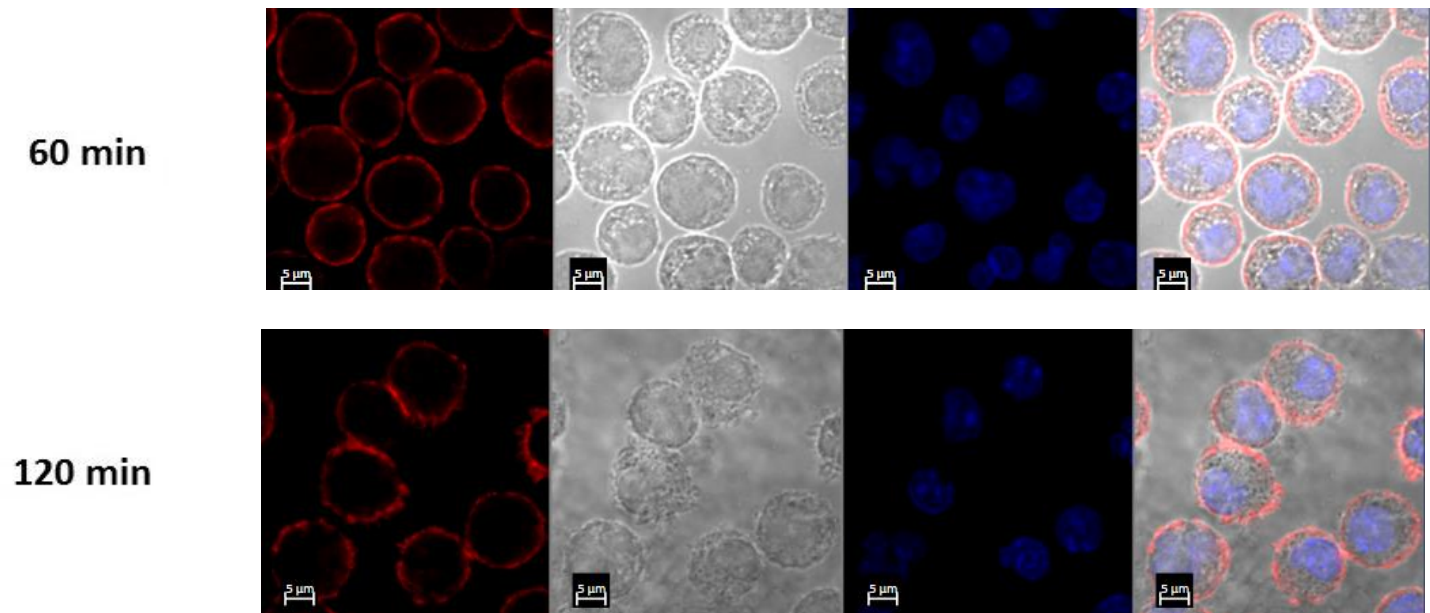


Figura 16. Reorganización del AAC en respuesta al LPI. Un millón de células por condición fueron incubadas con vehículo, S1P 100 nM o LPI 10 nM en diferentes tiempos (15, 30, 60 y 120 min.) Posteriormente las células fueron procesadas para microscopia confocal, incubadas con faloidina acoplada a rodamina (rojo) y DAPI (azul). Las imágenes se observaron en 63x, tomando 4 campos al azar para obtener una n=20 p por estímulo. Cuantificación pendiente*

Se analizaron las imágenes midiendo el perfil de distribución de la rodamina en imágenes representativas de cada condición (Figura 17). Se observa que, en condiciones basales, la intensidad máxima es de 34,940 unidades arbitrarias, con un ancho en la membrana de 1 a 1.5 μM y tamaño celular de 11 μm , como con el vehículo. Las células tratadas 30 min con S1P muestran un grosor de la membrana de 1.5 a 2 μm y un tamaño celular promedio de 13.7 micras, con un trazo irregular. Con un tratamiento de 15 min con LPI el grosor de la membrana aumenta a aproximadamente 3 μm y el tamaño celular alcanza un máximo de 14.2 μm . Después de 30 min, el grosor de la membrana y el tamaño de las células son similares a la condición previa. A los 60 minutos después del tratamiento, el grosor de la membrana regresa a condiciones similares a basales de aproximadamente 1 μm , pero el tamaño celular se mantiene aumentado, con un valor promedio de 13.5 micras. Finalmente, a los 120 minutos, el grosor en la membrana es de 2 μm , con un patrón irregular en el trazo del gráfico y las células mostraron un tamaño promedio de 14 micras.

Perfil del anillo de actina cortical

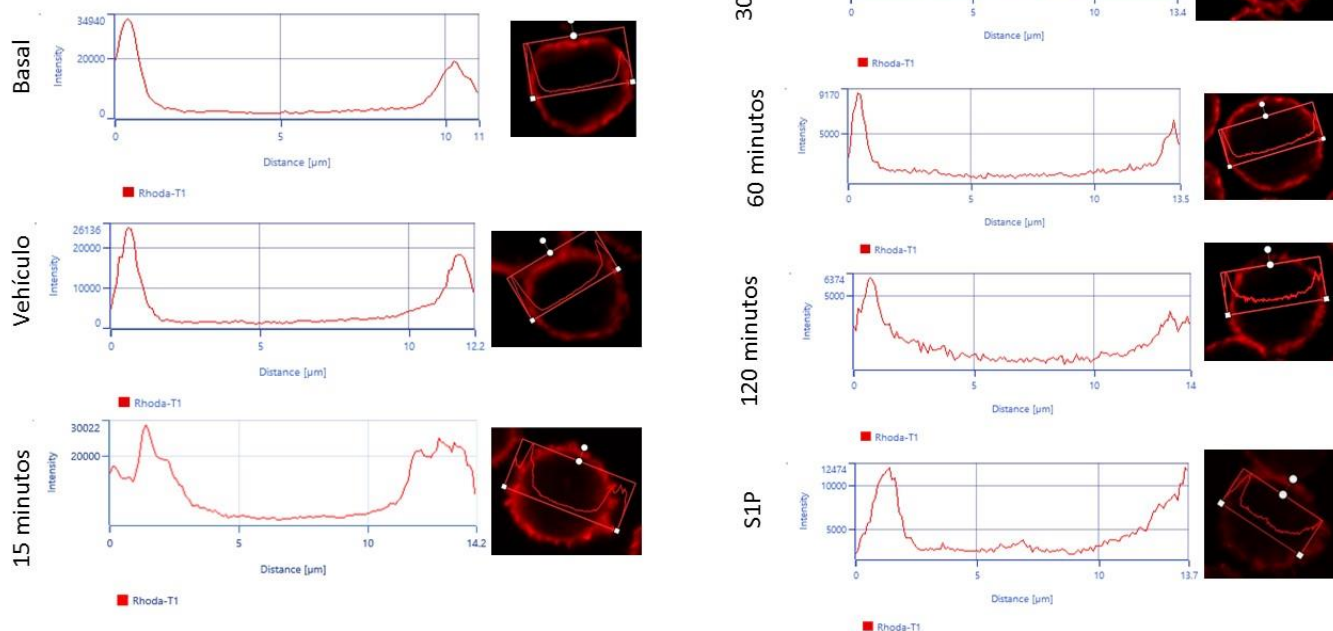


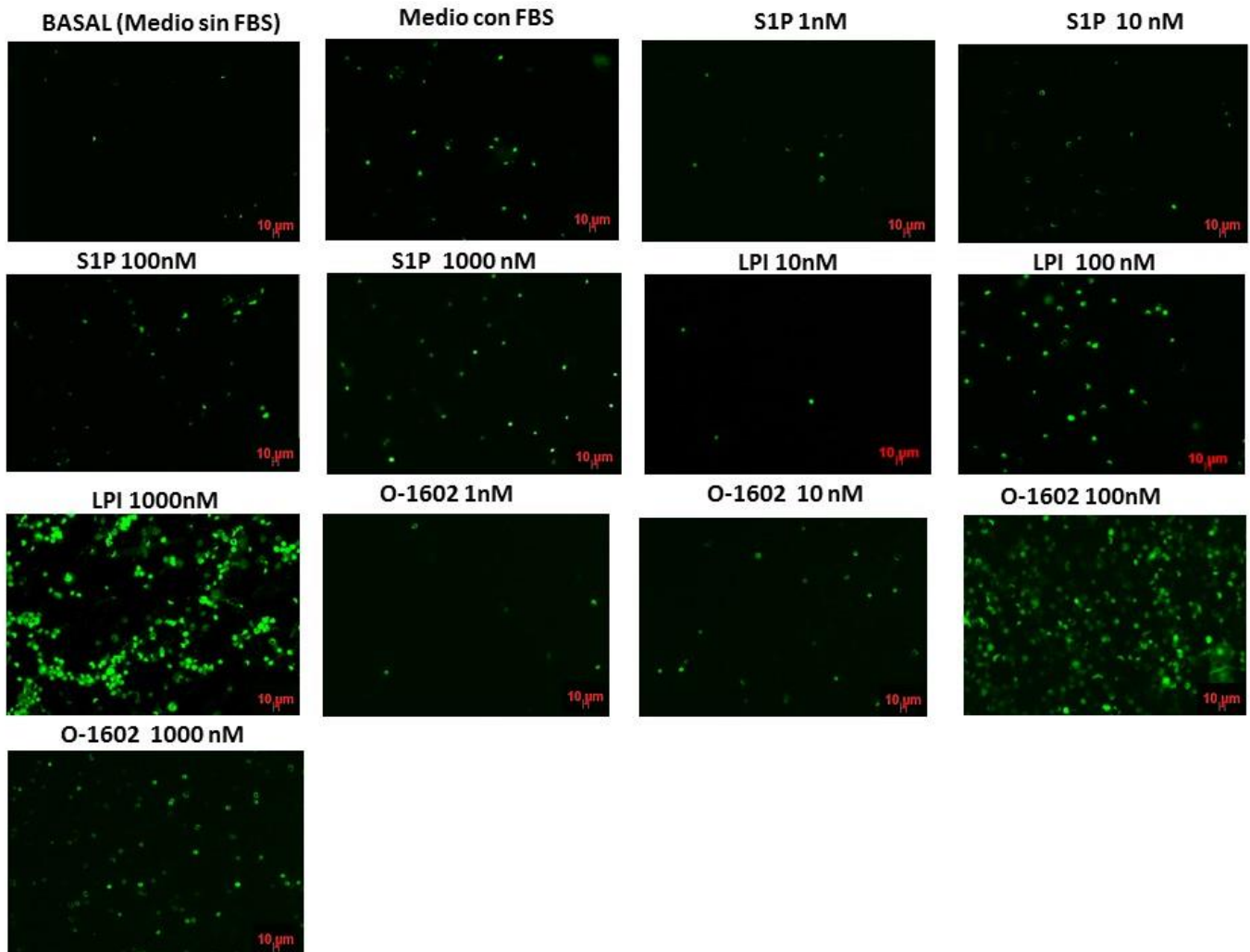
Figura 17. Análisis del perfil de polimerización del AAC. Se analizaron las imágenes representativas de cada condición utilizando el programa Zen 3.0 (blue edition). Con la aplicación de profile se graficó la intensidad y distancia de cada célula, analizándose 4 campos diferentes. En rojo se muestra la rodamina.

6.3.2 Efecto de la activación del GPR55 en la migración de las CCs

Para evaluar si el LPI a través del GPR55 induce la migración de las CCs, se utilizó la técnica modificada de la cámara de Boyden. Para el ensayo, se utilizaron diferentes concentraciones del LPI (10 nM, 100 nM y 1000 nM). Para corroborar que los efectos observados fueran exclusivos del GPR55 se realizaron ensayos con diferentes concentraciones del O-1602 (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM) y un antagonista del receptor, el ML-193, también con diferentes concentraciones (16 nM, 40 nM, 100 nM, 251 nM). Como control se realizó el ensayo con S1P (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM).

En la Figura 18, observamos los ensayos con el LPI, el O-1602 y la S1P. Todos los fármacos inducen la migración estadísticamente significativa con concentraciones de 100nM y 1000nM, sin embargo, se observa que los ligandos del GPR55, el LPI

y el O-1602, inducen más eficazmente la migración que la S1P. La concentración de LPI que generó mayor migración fue la de 1000 nM con un promedio de migración de 531 células por campo; para O-1602 la concentración más significativa fue la de 100 nM alcanzando, un promedio de 483 células por campo. De manera contrastante, la S1P, si bien si indujo la migración, lo hizo en menor medida que el LPI, dando un valor promedio de 205 células por campo a una concentración de 1000 nM. Por lo que el LPI demostró ser 2.5 veces más potente que la S1P para inducir la migración.



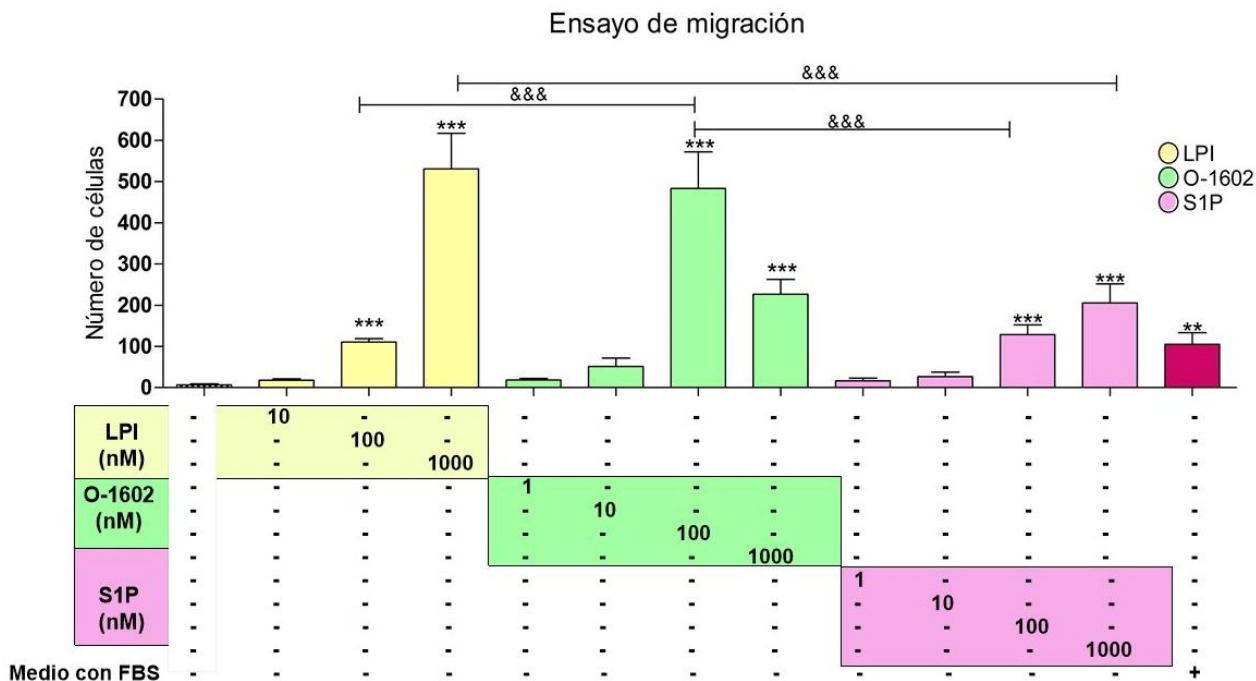


Figura 18. Migración de las CCs. 1×10^6 BMMCs se incubaron con calceína-AM ($1 \mu\text{L}/\text{mL}$). En los pozos inferiores se colocaron diferentes concentraciones de LPI (10 nM, 100 nM y 1000 nM), O-1602 (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM), SPI (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM) y como control positivo medio con FBS. En los pozos superiores se cargaron 40,000 células. La cámara se incubó por 3 horas a 37°C . Por cada experimento (“n”), se tomaron 4 campos al azar de cada concentración y se realizó un promedio del número de células. Se muestran los resultados de LPI en amarillo, de O-1602 en verde y en rosa claro los del S1P. Los resultados corresponden a 3 experimentos por condición. Las comparaciones de un mismo grupo se analizaron con un Anova de una vía seguida de una prueba de Tukey, mientras que las comparaciones entre grupos se analizaron con Anova de 2 vías seguida de una prueba de Bonferroni. * Diferencia significativa comparada con las condiciones basales ($p < 0.05$).

Con el fin de averiguar el papel del receptor GPR55 en la migración inducida por el LPI, se analizaron los efectos del antagonista ML-193 sobre la migración inducida por el O-1602 (Figura 19). Las células fueron pre-incubadas 15 minutos a 37°C con las diferentes concentraciones de ML-193, posteriormente se colocaron en la cámara de Boyden y se dejaron migrar hacia una concentración de 100 nM de O-1602. Los resultados se compararon contra células que no fueron pre-incubadas con el antagonista. En la gráfica de la Figura 19 se observa que existe una inhibición en la migración desde la concentración de 16 nM, siendo 100 nM la concentración que mayoritariamente inhibió. Con estos resultados corroboramos que los efectos en la migración de las BMMCs son dependientes del GPR55, dado que 100 nM de ML-193 inhibió casi en su totalidad la migración inducida por el O-1602.

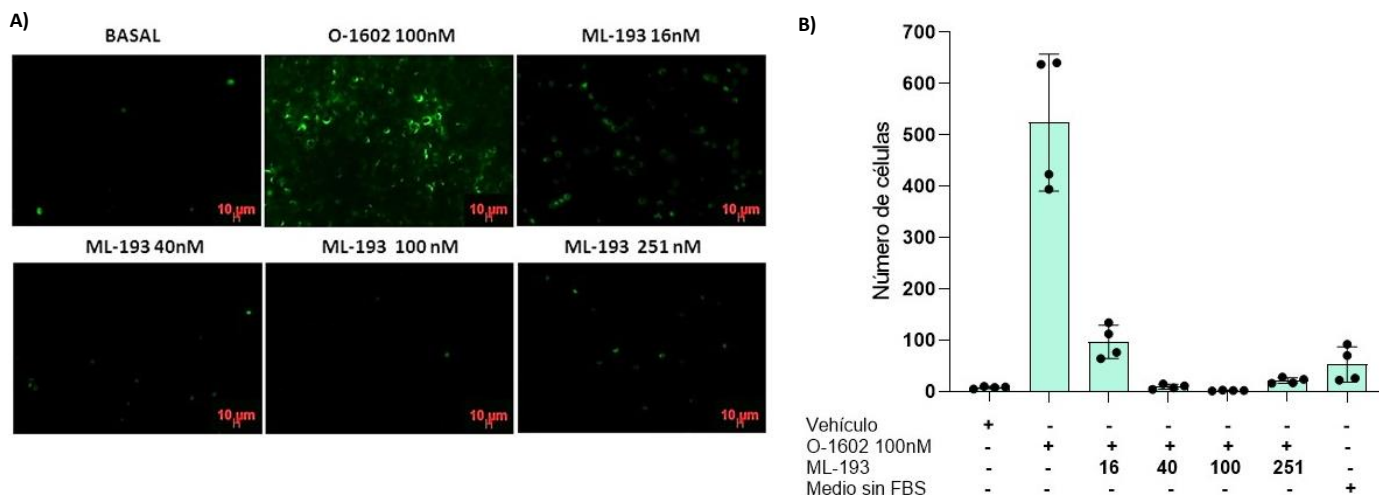


Figura 19. Efectos del ML-193 en la migración de CCs. 1×10^6 BMMCs fueron marcadas con calceína-AM ($1 \mu\text{L/mL}$) e incubadas con diferentes concentraciones de ML-193 (16, 40, 100 y 251 nM) por 15 minutos. Las células migraron por 3 horas hacia 100 nM de O-1602. Concluido el ensayo en la Cámara de Boyden las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia con el objetivo 20X. **Panel A)** Imágenes representativas de las diferentes condiciones. **B)** Análisis cuantitativo. Cada condición representa el promedio del número de células de 4 campos tomados al azar. Los resultados corresponden a un experimento.

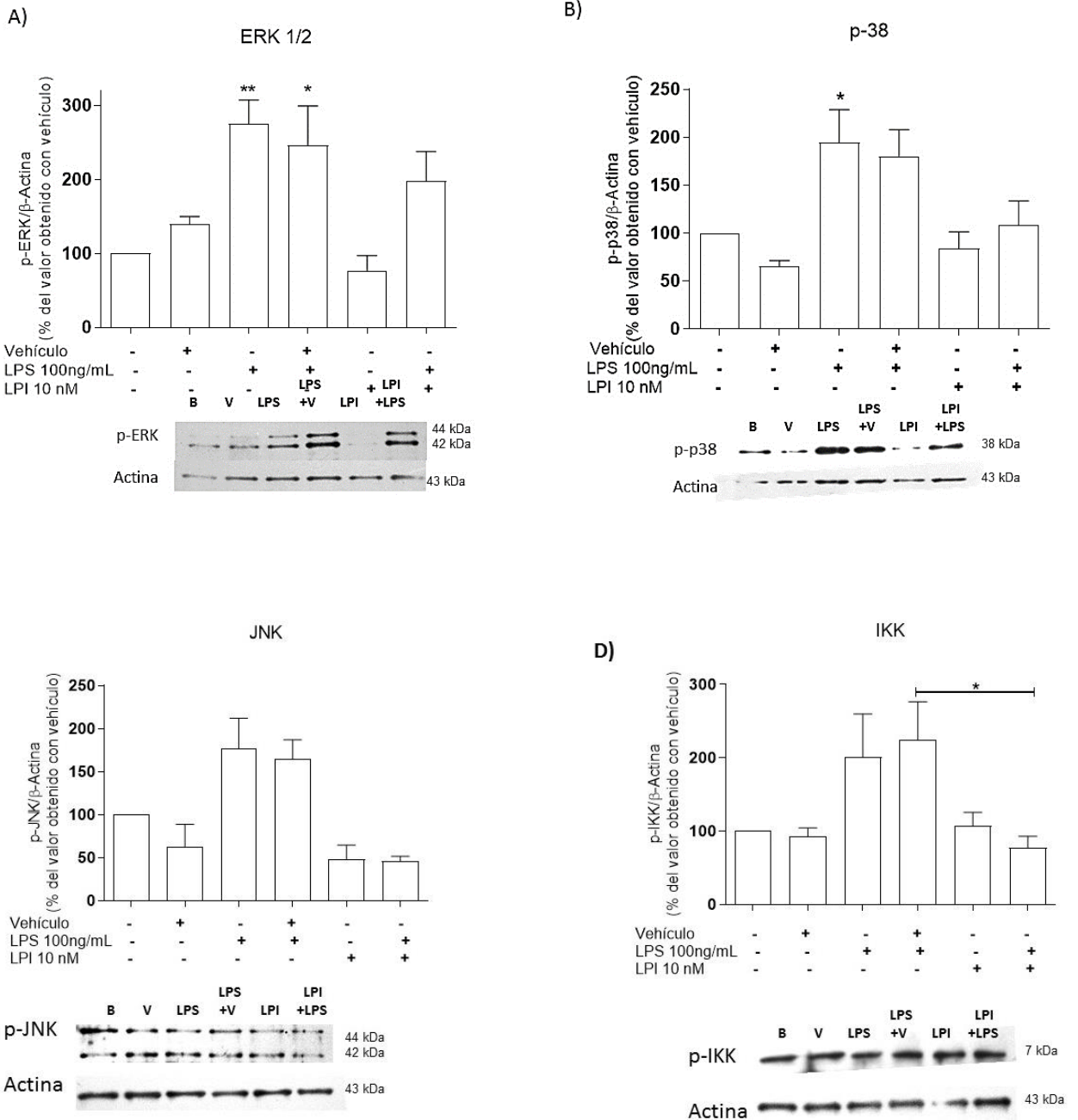
6.4 EFECTOS DEL LPI SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL TLR4

6.4.1 Efectos del LPI sobre proteínas de la vía canónica del TLR4

Para determinar si el LPI ejercía algún efecto sobre la vía de señalización del receptor TLR4 en las CCs, se realizó un análisis de las proteínas de la vía clásica de ese receptor activado por LPS mediante Western- Blot, en ausencia o presencia del LPI.

Se analizaron 6 proteínas de esta vía y sus cambios en fosforilación estimulados por LPS, dando una pre-incubación de 30 min con vehículo o con 10 nM de LPI. Las proteínas analizadas fueron ERK 1/2, p-38, JNK, IKK, TAK-1 y p-65. En la Figura 20 se muestran los resultados de este experimento. En el panel A se muestra la gráfica de la densitometría de la fosforilación de ERK 1/2 estimulada por LPS, en donde, si bien el LPI sí disminuye la fosforilación inducida por el LPS, este efecto no es estadísticamente significativo. Lo mismo sucede con p-p38 y con TAK-1 (paneles B y D), donde el LPI muestra una tendencia a disminuir la fosforilación mediada por LPS, sin que estos datos sean estadísticamente significativos. En los paneles C, D

y F se encuentran los resultados de JNK, IKK y p-65 respectivamente, en donde la pre-incubación con LPI sí inhibió la fosforilación mediada por LPS. En el panel F está el análisis de p-65, donde además de encontrar que el estímulo con LPI inhibe la fosforilación mediada por LPS, también se muestra que el LPI solo, es capaz de inducir la fosforilación de esta proteína, lo cual ya se encuentra reportado en la literatura.



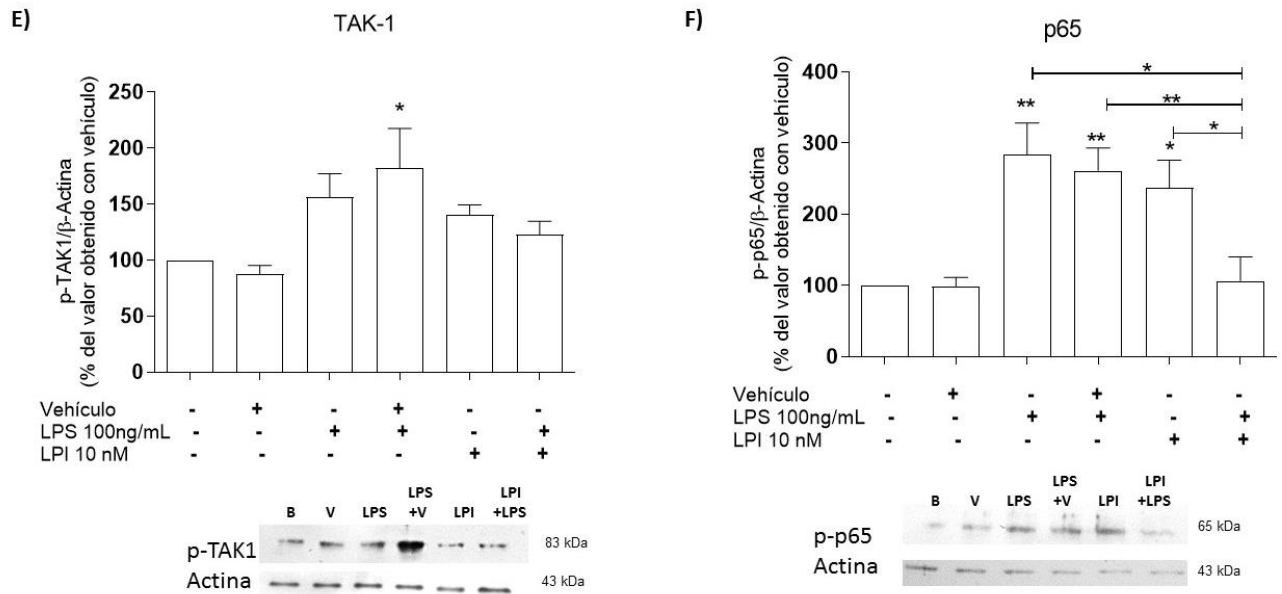


Figura 20. Análisis del efecto de LPI sobre la vía de señalización del TLR4. 2×10^6 de células por condición fueron incubadas con vehículo, 10 nM de LPI, 100 ng/mL de LPS o ambos a 37°C. Se muestran los Western-Blots representativos y su densitometría. En el panel **A) ERK, B) p-38, C) JNK, D) IKK, E) TAK-1 y F) p-65**. Los resultados corresponden a 3-5 experimentos independientes. Determinado por un análisis de varianza de una vía, seguido de una prueba de Dunnett y/o Tukey y análisis con T-Student. * Diferencia significativa comparada con las condiciones basales ($p < 0.05$).

6.4.2 Efectos del LPI en la expresión del mRNA de citocinas inducidas por la activación del TLR-4

La señalización del receptor TLR4 lleva a la síntesis de citocinas pro y anti-inflamatorias. Con el fin de caracterizar los efectos que el LPI pudiera tener sobre la síntesis de citocinas estimulada por ese receptor, se analizó el efecto que una pre-incubación con ese lípido pudiera tener sobre la síntesis de TNF- α , IL-6, IL-4, IL-2, TGF- β , VEGF y CCL2 estimulada por LPS.

Los resultados obtenidos en la expresión del mRNA (Figura 21) muestran que el LPS aumenta la síntesis de dichas citocinas, y que la pre-incubación con 10 nM de LPI induce una inhibición en su expresión. Asimismo, se observa que el LPI por sí induce la síntesis de TGF- β siendo la única citocina en donde se observa este efecto.

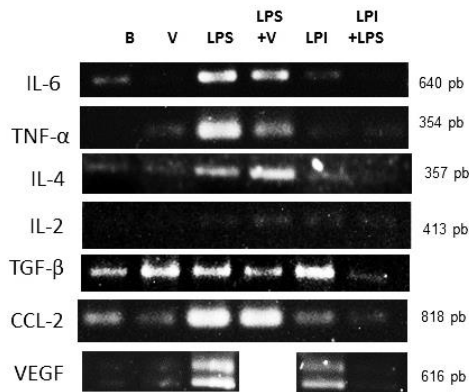
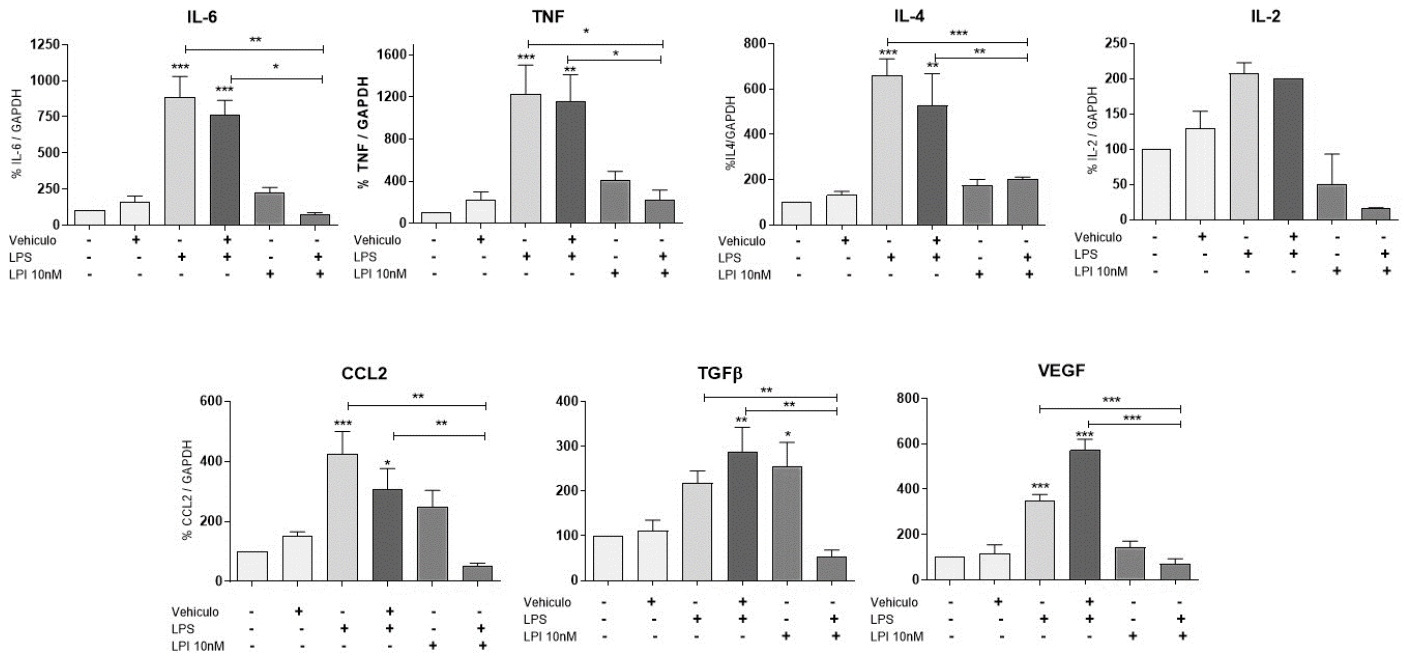


Figura 21. Efecto del LPI en la expresión de mRNA de diferentes citocinas. Dos millones de células fueron tratadas con vehículo, 10nM de LPI, 100ng/mL de LPS o ambos a 37°C. Se muestran las imágenes representativas de la expresión del RNA y su análisis estadístico. Los resultados corresponden a 2-4 experimentos independientes. Determinado por un análisis de varianza de una vía, seguido de una prueba de Dunnett y análisis con T-Student. * Diferencia significativa comparada con las condiciones basales ($p < 0.05$).

7.-DISCUSIÓN

La acción de los lípidos bioactivos sobre las células del sistema inmune es un campo de gran interés en inmunología, debido al potencial efecto modulador que esas moléculas pueden tener en las reacciones inflamatorias. De especial interés es el estudio de esos lípidos (como el LPI) sobre las CCs, debido a que este tipo celular desencadena reacciones inmunes inmediatas y participa de manera importante en la inflamación crónica. En este trabajo se estudiaron los efectos del LPI sobre la fosforilación de proteínas y la quimiotaxis en CCs, así como su efecto en el sistema de señalización del receptor TLR-4.

Los principales hallazgos obtenidos en la presente investigación son los siguientes: 1) El LPI no induce la desgranulación de las BMMC; 2) El LPI y el agonista sintético del GPR55 (O-1602), inducen la fosforilación de la MAPK ERK1/2; 3) el LPI, el O-1602 y la S1P provocan cambios en el estado de la fosforilación de las proteínas LIMK y cofilina; 4) el LPI induce cambios en la polimerización del anillo de actina cortical característicos de la adquisición de un fenotipo migratorio; 5) el LPI y el O-1602 son quimioatrayentes de las CCs, y tienen una mayor potencia que la S1P; 6) el antagonista del GPR55 (ML193) inhibió los efectos del O-1602 sobre la migración; 7) El tratamiento de las BMMC con LPI previene la fosforilación de JNK, IKK y NF κ B (p-65) y la síntesis de mRNA de citocinas dependientes de la activación del receptor TLR-4.

La desgranulación de las CCs consiste en la liberación de una gran variedad de mediadores con diferente actividad biológica contenidos en los gránulos preformados. Debido a que la liberación del contenido granular es rápida y desencadena la fase temprana de las respuestas alérgicas, se considera que ese evento es el más característico de las CCs. Se induce tras la activación mediada por diversos estímulos, que pueden ser dependientes de una reacción antígeno-anticuerpo (a través del receptor Fc ϵ RI) o independientes de anticuerpos y receptores Fc (a través de GPCRs y otros receptores). ⁽¹⁰²⁾ Nuestros resultados demuestran que, a diferencia de los complejos IgE/Ag y al igual que la S1P, el LPI

no induce la desgranulación de las BMMCs. Los resultados con la S1P concuerdan con lo reportado por Prieschi y colaboradores (1999)⁽¹⁰³⁾ y Jolly y colaboradores (2004)⁽⁵⁰⁾, quienes utilizando el mismo modelo celular (BMMCs) no observaron que la S1P (10 nM-30 μ M), indujera una desgranulación estadísticamente significativa. Con respecto al LPI, Goth y colaboradores (1971),⁽¹⁰⁴⁾ demostraron que el fosfatidilinositol (precursor del LPI) únicamente genera 7% de desgranulación en CCs derivadas del peritoneo de ratas, lo cual no es diferente del valor obtenido en células no estimuladas. Nuestros resultados serían la primera evidencia de que el LPI no participa en la desgranulación de CCs murinas derivadas de médula ósea, y sugieren que los efectos del LPI no incluyen necesariamente la liberación rápida del contenido granular.

Debido a que hay numerosos agentes que no inducen desgranulación, pero pueden tener otros efectos en las CCs, evaluamos algunas vías canónicas de señalización que indican la activación de ese tipo celular. En nuestro estudio observamos que el LPI y el O-1602 inducen la fosforilación de ERK 1/2, con un pico en la fosforilación a los 10 minutos. La cinética que observamos en la fosforilación de ERK 1/2 por LPI ya fue reportada en otros modelos celulares (HEK-293), en donde el efecto máximo se observó a los 5 minutos.⁽¹⁰⁵⁾ Si bien los efectos que observamos en las CCs son un poco más tardíos, cabe señalar que tanto el modelo celular como las condiciones experimentales son distintas.

También observamos que el O-1602 parece ser más potente que el LPI para inducir la fosforilación de ERK 1/2, debido a que la concentración de 10 nM de O-1602 provocó la fosforilación de ERK 1/2 a los 10 minutos con la misma intensidad que 100 nM de LPI. Esto concuerda con las EC₅₀ reportadas de ambos ligandos, que son, para el O-1602, de 13 nM (Ryberg y colaboradores, 2007)⁽⁷⁸⁾ y para el LPI, de 200 nM (Oka y colaboradores, 2007).⁽¹⁰⁵⁾ Para corroborar que realmente el O-1602 es más potente que el LPI, sería útil estudiar los efectos de concentraciones menores del O-1602 (1 nM, por ejemplo) y contrastarlos con los efectos de concentraciones más pequeñas de LPI (por ejemplo, 10 nM), para ver si esta relación se mantiene. Otro aspecto interesante por estudiar serían los efectos

fisiológicos a los que conduce la activación de ERK 1/2 en este modelo celular. Se sabe, en otros modelos, que la activación de ERK 1/2 por el LPI induce a un marcado incremento dependiente de la concentración en la fosforilación de CREB ⁽⁹⁶⁾ y se sabe que CREB participa en la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, ⁽¹⁰⁶⁾ por lo que efectuar futuros experimentos para averiguar si el LPI afecta la proliferación y sobrevivencia de las CCs a través de la activación de ERK1/2 y CREB sería muy útil para documentar acciones fisiológicas no descritas hasta ahora para el LPI sobre este tipo celular.

Uno de los efectos más importantes que el LPI tuvo sobre las CCs fue inducir la fosforilación de proteínas implicadas con cambios en el citoesqueleto. Como era de esperarse, la S1P indujo la activación de LIMK y cofilina. Al ser un quimioatrayente conocido de distintos tipos celulares del sistema inmune, ya se ha reportado anteriormente los efectos de la S1P en la activación de estas proteínas en otros modelos celulares. ^(107, 108)

Nuestros datos muestran que el LPI y el O-1602 son capaces de inducir cambios en la fosforilación de las proteínas LIMK y cofilina, aunque en tiempos más tardíos que la S1P. El LPI y el O-1602 son equieficaces para inducir la fosforilación de LIMK, ya que produjeron una cinética similar en el curso temporal de fosforilación. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura, donde la afinidad de ambos compuestos para inducir la activación de RhoA es la misma, $EC_{50}=1 \mu M$. ^(96,109) Si bien ya se sabía que el LPI conduce a la activación de RhoA y de ROCK, ésta es la primera evidencia sobre la participación del LPI en la activación de LIMK y cofilina.

La diferencia entre las cinéticas de activación de LIMK y cofilina, con los agonistas del GPR55 (LPI y O-1602) y la S1P, se explica debido a que los mecanismos de señalización que son activados por cada ligando son diferentes. Mientras que el GPR55 está acoplado a proteínas G12/13 y activa a la GTPasa pequeña Rho, conduciendo a la activación de ROCK-LIMK-cofilina, la S1P utiliza al S1PR1, el cual está acoplado a una proteína Gi que induce la activación de LIMK y cofilina a través de la GTPasa pequeña Ras y la subsecuente activación de PAK. Estas diferencias en la señalización podrían ser las responsables de la diferencia en las cinéticas.

Respecto a la cofilina, el LPI indujo fosforilación, mientras que la S1P y el O-1602 provocaron su desfosforilación. Independientemente del efecto, todos los ligandos generaron cambios en su estado de activación por lo que concluimos que todos modulan a esta proteína. Esta falta de correlación entre la proteína LIMK y cofilina es explicable por dos situaciones. Primero, en cada experimento se utilizaron 2 millones de células que no estuvieron sincronizadas de ninguna manera y estaban en suspensión. Esto debió ocasionar que el estímulo produjera cambios en diferentes sitios de la célula. Así, mientras que en unas regiones se podría estar formando el extremo guía y diversos tipos de prolongaciones, en otras regiones de la misma célula podrían existir contracciones y la formación del urópodo. Debido a esto, al observar los efectos globales en las células, es entendible que existan diferencias entre la cantidad de formas fosforiladas y desfosforiladas de esta proteína. Segundo, aunque la LIMK es la principal proteína que fosforila a la cofilina, hay otras proteínas que regulan este evento, tal es el caso de las proteínas TESK 1/2 o las proteínas PPAR2, ^(39, 110) que fosforilan a cofilina en el mismo sitio que LIMK (ser3). Por lo dicho hasta ahora, las diferencias en la fosforilación y desfosforilación de la cofilina con los distintos ligandos son esperadas.

Durante la migración se producen cambios en el anillo de actina cortical (AAC). Los resultados muestran que la S1P (100 nM) y el LPI (10 nM) indujeron cambios en el AAC. Los hallazgos con la S1P están en línea con lo reportado por otros autores, Jolly y colaboradores (2004),⁽⁵⁰⁾ en otro modelo de CCs conocido como RBL-2H3, demostraron la presencia de estructuras onduladas denominadas ruffles en la membrana, una redistribución de la F-actina hacia el AAC y la formación de protrusiones remanentes del lamelipodio en respuesta a ese lípido.

Existen pocos estudios que analicen los efectos del LPI en el AAC en células del sistema inmune, el único antecedente a nuestro trabajo es el de Balenga y colaboradores (2011),⁽⁷²⁾ quienes observaron que el LPI indujo cambios en el AAC.

Nuestros resultados son sugerentes de un fenotipo migratorio debido a que observamos la polarización del núcleo, engrosamiento-adelgazamiento (polarización-despolarización) del AAC, la formación de prolongaciones similares a

filopodios y el aumento en el diámetro celular. Un diseño experimental diferente, en donde tengamos un gradiente de concentración que estimule a la célula en un solo punto nos permitirá observar el fenotipo migratorio típico. En esos experimentos también será conveniente crecer a las CCs sobre un soporte fijo, para que pueda establecerse el fenotipo migratorio. Debido a que otros autores han encontrado la participación del sistema endocannabinoide en las acciones del LPI, es necesario realizar estudios para saber si los receptores para endocannabinoides (eCN) expresados en las CCs pudieran ser responsables de algunos efectos del LPI.

El LPI y el O-1602 resultaron ser potentes quimioatrayentes de las CCs, induciendo la migración de manera más evidente que la S1P. El papel de la S1P en la migración se conoce desde hace tiempo en diversos tipos celulares del sistema inmune, incluyendo las CCs. Jolly y colaboradores (2004)⁽⁵⁰⁾ demostraron que las células RBL-2H3 migran hacia la S1P mediante la activación del S1PR1 logrando un efecto máximo de 250-300 células por campo con 10 nM de S1P. En BMMCs, Olivera y colaboradores (2006),⁽¹¹¹⁾ también demostraron que la S1P induce la migración, pero en menor medida que en las RBL-2H3.

Nuestros resultados sugieren que la activación del receptor GPR55 es responsable de la quimiotaxis, ya que un ligando endógeno de este receptor (LPI) o uno sintético (O-1602), estimulan la migración de las CCs, incluso más que la S1P. De manera particular, nuestra investigación reporta, por primera vez, que existe un quimioatrayente más potente que la S1P para las CCs: el LPI.

La diferencia encontrada entre los agonistas del GPR55 y la S1P posiblemente se deba a diferencias en las vías de señalización que inducen la migración. Por ejemplo, cabe mencionar que el S1PR1, que es el receptor de la S1P involucrado en migración, es regulado negativamente por el receptor S1PR2, y dado que la S1P que usamos no discrimina entre receptores es difícil aislar el efecto exclusivo del S1PR1.

Los efectos del LPI en la migración abre nuevas áreas de investigación para la modulación de procesos inflamatorios. Recordemos brevemente que el fingolimod (un pro-fármaco antagonista del receptor S1PR1), genera una disminución en la

migración de células inmunes al antagonizar a receptores de S1P limitando la inflamación. Nuestro estudio sugiere que antagonistas del receptor GPR55 también se podrían utilizar como una herramienta farmacológica para frenar la migración celular, sin embargo, faltan estudios en otras células del sistema inmune, así como conocer más a detalle sobre los mecanismos que regulen este proceso.

Existen antecedentes del LPI como quimioatrayente en otros modelos celulares, sin embargo, estos estudios fueron realizados en células transformadas de cáncer de mama⁽⁶⁴⁾ y colon,⁽⁶⁵⁾ y, en ambos casos, se utilizaron concentraciones altas (1-2.5 μ M) y tiempos de exposición prolongados (17-24hrs). En células del sistema inmune el conocimiento es limitado. Balenga y colaboradores (2011)⁽⁷²⁾ observaron que LPI (3 μ M) indujo la migración y esto se inhibió parcialmente con cannabidiol (antagonista del GPR55. Ver Tabla 2).

Las diferencias en las concentraciones necesarias de LPI y O-1602 para inducir la migración (1000 nM en el caso del LPI y 100 nM en el caso del O-1602) pueden deberse a distintas razones. Lo primero que hay que considerar es si los efectos del LPI se producen exclusivamente a través de la activación del GPR55 o si existe la participación de los receptores a cannabinoides (CBRs). Sabemos que el LPI no se une a receptores a cannabinoides, por lo que, de existir una participación de los CBRs, ésta podría deberse a la heterodimerización del GPR55 a estos receptores o al metabolismo del LPI a 2-AG (que sí podría activar a receptores CB). Por otro lado, el O-1602 tampoco activa a los receptores de cannabinoides a las concentraciones que nosotros utilizamos, pero otros autores como McHugh y colaboradores (2010)⁽¹¹²⁾ y Schicho y colaboradores (2011)⁽¹¹³⁾ sugieren que el O-1602 en neutrófilos actúa independientemente del GPR55, proponiendo que los efectos en la migración son dependientes de otro receptor huérfano, el GPR18 (kd=65.3nM).⁽¹¹⁴⁾ Hasta la fecha, no se tiene información de la expresión del GPR18 en las BMMCs.

Para corroborar que los efectos sobre la migración estuvieran mediados por el GPR55, se utilizó al antagonista ML-193, observando que este fármaco inhibe la migración de las BMMCs inducida por el O-1602. La IC50 reportada del ML-193

para inhibir los efectos del LPI es de 220 nM, aunque en nuestro estudio observamos la inhibición casi total de la migración con 100 nM, e incluso, desde concentraciones más bajas (16 nM), este comportamiento farmacológico sugiere que el O-1602 induce la migración a través del GPR55 y no a través del GPR18.

Será interesante concluir los experimentos del bloqueo de la migración inducida por O-1602 y por LPI con el ML-193, ésto ayudaría a dilucidar el posible papel del GPR55 en la respuesta migratoria. Al mismo tiempo, estudiar la participación de los receptores CB1, CB2 y GPR18 con antagonistas específicos, nos ayudaría a entender mejor el fenómeno observado.

Con los resultados previos finalizamos el estudio del LPI en condiciones homeostáticas. Debido a que existe evidencia de la participación de este lípido como un posible HAMP, continuamos evaluando sus efectos en un modelo de inflamación mediado por la activación del TLR-4.

Estudiamos el efecto del LPI (10 nM) sobre proteínas de la vía canónica del TLR4 activada por el LPS (100 ng/mL) y encontramos que las proteínas JNK, IKK y p-65 no se fosforilan cuando las células son pre-incubadas con el lípido y tratadas con el LPS. De manera interesante, la pre-incubación con LPI no ocasionó cambios significativos en la fosforilación de ERK1/2, p-38 o TAK-1 en respuesta al LPS, ésto indica que el bloqueo inducido por el GPR55 sobre la vía de señalización del TLR4 es específico y debe ocurrir en un punto necesario para que se lleve a cabo la activación de ERK1/2, p38 o TAK-1 pero no de JNK, IKK y p-65. Este bloqueo en la vía de señalización condujo al bloqueo de la síntesis del mRNA de las citocinas evaluadas (TNF, IL-6, IL-4, TGF- β , IL-2, VEGF y CCL2). El control de los mRNA para distintas citocinas en las células cebadas es un proceso complejo que involucra no solamente la inducción de la transcripción a través de factores específicos, sino también cambios en la regulación de la vida media de los mRNA y la traducción de las proteínas.

Existen estudios que demuestran la comunicación cruzada de las vías inducidas por el receptor GPR55 con las del receptor TLR4. Por ejemplo, Saliba y colaboradores (2018),⁽¹¹⁵⁾ realizaron un screening de diferentes antagonistas del GPR55 derivados

de la cumarina y demostraron que el compuesto KIT-17, al antagonizar al GPR55, inhibe significativamente la liberación de PGE₂ inducida por LPS (10 ng/mL) en células primarias de microglía de ratas y demostraron que este efecto es dependiente de la disminución de COX-2 y mPGE₂ e independiente del sistema endocannabinoide. Concluyeron que el antagonista KIT-17 tiene una función anti-inflamatoria, debido a que ejerce un agonismo inverso en el GPR55, alterando la vía de señalización del TLR-4, lo que disminuye la inflamación.

Masquelier y colaboradores (2018)⁽⁶⁸⁾ incubaron macrófagos murinos de la línea J774 con 10 µM de LPI y los activaron con LPS (100 ng/mL) por 8 horas. En tales condiciones, observaron que el LPI disminuyó la expresión del mRNA de IL-1β, IL-6 y COX-2, y que, al antagonizar al GPR55 con el antagonista CID16020046, se invertía este efecto. Para estudiar si había una regulación bidireccional entre el TLR-4 y el GPR55 realizaron un experimento *in vivo*. Inyectaron LPS (300 µg/kg) intraperitoneal en ratones C57BL6/J por 4 y 8 horas, sacrificaron a los animales y analizaron la concentración de LPI en diferentes tejidos, encontrando que estaba incrementado por la inflamación en hígado, bazo y pulmón (en este último sólo la especie 18:2 del LPI), mientras que en colon hubo un decremento en la concentración. Este antecedente refuerza la teoría de que el LPI se comporta como un HAMP, tanto en un modelo de macrófagos como en nuestro propio modelo de CCs.

Finalmente, Hill y colaboradores (2019)⁽¹¹⁶⁾ trataron a ratones C57BL/6 con LPS de forma crónica, y mostraron que agonistas del GPR55 (O-1602) protegen contra la reducción de neurogénesis mediada por IL-1β, además de inhibir la expresión de mRNA de citocinas inflamatorias; incluso, en animales GPCR55^{-/-} observaron que existe una prolongación de la respuesta inflamatoria mediada por IL-1β, IL-6 y TNF-α, concluyendo que la activación del GPCR55 produce una respuesta protectora, así como una posible existencia de un *crosstalk* entre el GPCR55 y el TLR4.

Nuestros resultados coinciden con esos datos, ya que en nuestro modelo de inflamación en BMMCs, el LPI regula negativamente al TLR-4, como en los estudios de Hill y colaboradores o Masquelier y colaboradores.

El cómo se lleva a cabo la interacción a nivel molecular entre el receptor GPR55 y el TLR4 es un punto interesante por evaluar en estudios futuros. En nuestro estudio, se resalta el hecho de que de las MAPK analizadas, únicamente JNK fuera inhibida por el pre-tratamiento con LPI, y que también la cinasa IKK fuera inhibida. Debido a que en la vía canónica de señalización del receptor TLR4 las MAPK e IKK son brazos independientes, es posible pensar que la inhibición dada por el LPI puede ocurrir en dos puntos distintos de la vía. Sin embargo, también existe evidencia de vías no canónicas de señalización del TLR4, lo que abre nuevas posibilidades en los puntos donde el LPI pudiera bloquear la señal del TLR4.

Por ejemplo, diferentes grupos (DeSmaele y colaboradores 2001, Papa y colaboradores 2004, Moriguchi y colaboradores 2004, Tang y colaboradores 2001)⁽¹¹⁷⁻¹²⁰⁾ han demostrado una comunicación cruzada entre las vías de IKK/NFκB y JNK. DeSmaele y colaboradores (2001),⁽¹¹⁷⁾ encontraron que NFκB activa a la proteína Gadd45β, la cual inactiva a MKK7/JNKK2, que actúa río arriba de JNK e induce su activación. Si esta vía existiera en BMMCs, el bloqueo de NFκB llevaría también a la inhibición de JNK. Otras propuestas incluyen a los ROS (Sakon y colaboradores, 2003)⁽¹²¹⁾ o a la proteína XIAP, que también es blanco de NFκB y su inducción disminuye a JNK sin afectar a p-38 y ERK 1/2.⁽¹²⁰⁾ Independientemente de cómo se lleve a cabo el *crosstalk* entre NFκB y JNK, es clara la existencia de esta interacción. Si NFκB y JNK estuvieran conectados de alguna manera en las CCs, entonces los efectos inhibidores del LPI podrían estar en un solo punto: la cinasa IKK, y eso sería suficiente para conducir a la inhibición de NFκB (p-65) y de JNK.

Si bien la inhibición del LPI sobre el sistema de señalización del TLR4 puede ser en IKK, también podría deberse a otras razones e involucrar a otras proteínas. Los efectos de otros lípidos bioactivos sobre células del sistema inmune y la evidencia existente de comunicación cruzada de otros GPCRs con el TLR4, o la participación del sistema endocannabinoide podrían ofrecer una explicación a la inhibición observada.

Jackson y colaboradores (2008), ⁽¹²²⁾ observaron que una de las enzimas que regula la síntesis de lisofosfatidilcolina (LPC), la lisofosfatidilcolina aciltransferasa, regula la translocación del TLR-4 a balsas lipídicas en la membrana lipídica y, por consiguiente, regula las funciones del TLR-4. Más recientemente Wang y colaboradores (2016), ⁽²⁶⁾ en estudios con micro-arreglos, demostraron que el LPA disminuye la expresión de los receptores TLR-7 y TLR-3, mientras que la S1P inhibe la expresión del TLR-5. Si bien nosotros no evaluamos los efectos del LPI sobre la expresión del TLR4, sería interesante realizarlos y observar si la cantidad de TLR4 en células pre-tratadas con LPI es la misma que la existente en células pre-tratadas con el vehículo.

Por otro lado, dentro de la vía de señalización del GPR55, una de las proteínas fundamentales es la proteína Rho y río abajo, la cinasa de unión a Rho (ROCK). Algunos autores demostraron que la inhibición farmacológica de estas proteínas aumenta la producción de citocinas, así como la fosforilación de algunas proteínas en el sistema del TLR4. Gruber y colaboradores (2018)⁽¹²³⁾ inhibieron a ROCK 1/2 en macrófagos y observaron que ésto potenció la producción de TNF- α y la fosforilación de proteínas como NF κ B, ERK 1/2 y p-38. En astrocitos, distintos autores (Konat y colaboradores, 2008 y Borysiewicz y colaboradores, (2009) ^(124,125) antagonizaron a proteínas Rho con toxina B y observaron que la inhibición aumenta la expresión de genes de citocinas inducidas por LPS como IL-1 β , TNF- α , IL-6 y TGF- β lo cual también se vió a nivel protéico. Estos antecedentes sugieren que Rho o ROCK, activadas por el LPI, pueden ser las proteínas que interactúan con el sistema del TLR.

La interacción GPCRs-TLR4 ha sido documentada en repetidas ocasiones. Por ejemplo, en nuestro laboratorio, Madera-Salcedo y colaboradores (2013), ⁽¹⁰⁰⁾ demostró que otros receptores GPCRs, como son los receptores a opioides μ y δ , también modulan los efectos del TLR4 en BMMCs. Sin embargo, esa modulación se observó en proteínas río arriba, como TAK-1 y TRAF-6, sugiriendo que la proteína β -arrestina (componente de las vías de señalización activadas por todos los GPCRs) se unía a TRAF-6 previniendo su ubiquitinación y, por ende, inhibiendo

la vía. Adicionalmente, otros autores ⁽¹²⁶⁾ encontraron que la β -arrestina inhibe la fosforilación de I κ B α , disminuyendo su degradación y, por ende, bloqueando la liberación de NF κ B. También se sabe que la subunidad β 1 de las proteínas G interactúa directamente con la deacetilasa de histona (HDAC) que regula la expresión de genes inflamatorios inducidos por el LPS. ⁽¹²⁷⁾ Las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGSs) también regulan al TLR-4. Lattin y colaboradores (2007), ⁽¹²⁸⁾ mencionan que las RGS1, 2, 10, 18 y 19 están expresadas en macrófagos y modulan los efectos producidos por el LPS aunque no mencionan el mecanismo. Finalmente, las cinasas reguladoras de proteínas G (GRKs) como la GRK1 regulan la desensibilización del receptor TLR4. ⁽¹²⁹⁾ Estas evidencias muestran que los GPCRs pueden interactuar con la vía del TLR-4 por diferentes mecanismos y alguno de ellos podría estar participando en los efectos inhibitorios del LPI sobre la señalización del TLR4 que nosotros observamos.

Finalmente, los efectos del LPI y de agonistas del receptor GPR55 sobre el receptor TLR4 podrían requerir de la participación del sistema endocannabinoide. En nuestro laboratorio, Espinosa-Riquer et al (2019),⁽²⁷⁾ en un modelo de tolerancia crónica inducido por el endocannabinoide, 2-Araquidonoilglicerol (2-AG), observaron un efecto similar en la vía del TLR4, con la inhibición de p-65 e IKK pero no de ERK o p-38. En dicha investigación, se encontró que los efectos del 2-AG requerían del receptor CB2. Aunque en ese trabajo no se evaluó a la proteína JNK, es interesante que el LPI ocasione efectos similares a los del 2-AG, por lo que será necesario comprobar si existe o no la posibilidad de la participación de un dímero entre el GPR55 y el CB2 en las acciones del LPI. En BMMCs, Cruz y colaboradores (2018), reportaron un posible dímero entre el GPR55 y el CB₂ para explicar las acciones de otro endocannabinoide, la anandamida, sobre la desgranulación de las CCs estimulada por el receptor Fc ϵ RI. ⁽⁹⁸⁾

El LPI es un lípido “recientemente redescubierto” que ha mostrado semejanzas con otros lípidos bioactivos como la S1P, de los cuales se tiene un amplio conocimiento sobre su participación en funciones fisiológicas y patológicas e incluso ha sido considerada como blanco terapéutico para controlar la inflamación.

En este estudio observamos los efectos del LPI como un probable HAMP, dado que en situaciones fisiológicas induce la activación de ERK 1/2, así como de proteínas que regulan el citoesqueleto (LIMK y cofilina), lo que determina su papel en la migración. Por otro lado, en condiciones patológicas, es capaz de regular negativamente las respuestas del TLR-4 e inducir mecanismos anti-inflamatorios que regresan a la célula a la homeostasis.

Nuestros resultados resaltan la importancia de este lípido en respuestas inmunes y sugiere que el LPI y/o el GPR55 deberían considerarse como un blanco terapéutico en procesos inflamatorios de tipo agudo o crónico. En procesos agudos otros lípidos provenientes de la dieta como el aceite de oliva o pescado han demostrado tener efectos neuroprotectores, Morales-Martínez y colaboradores (2019), ⁽¹³⁰⁾ observaron que estos ácidos grasos enriquecen la membrana de sinaptosomas mejorando la fluidez de la membrana y confieren un efecto anti-oxidante previniendo el daño oxidativo. En procesos inflamatorios crónicos como cáncer, tanto el LPI como las CCs han demostrado una importante participación. ^(64,65) Recientemente Kaesler y colaboradores (2019), ⁽¹³¹⁾ demostraron que las CCs en cáncer de piel (melanoma), son activadas por el LPS producido por la microbiota y que su activación regula la defensa inmune del tumor a expensas de células T, por lo que modular este tipo de respuestas tendrá repercusiones clínicas importantes.

Antecedentes como estos remarcan la importancia de la participación de las CCs en el sistema inmune innato y sugieren que nuevas aproximaciones terapéuticas, como la manipulación del binomio LPI/GPR55 pueden ser estrategias útiles en diferentes patologías. Será entonces relevante conocer el alcance de las funciones del LPI en diferentes condiciones para generar conocimiento suficiente que justifique su uso como un modulador de las respuestas inflamatorias en las CCs.

8.-RESUMEN DE RESULTADOS

El LPI en condiciones fisiológicas participa en la activación de proteínas como ERK 1/2, LIMK y cofilina en CCs, induciendo cambios en el anillo de actina cortical y la migración con una potencia mayor a la observada con S1P. (Ver Figura 22)

Ante un estímulo patológico, el LPI disminuyó las acciones pro-inflamatorias del receptor TLR-4, al inhibir la fosforilación de JNK, IKK y p-65 inducida por LPS y previniendo la acumulación del mRNA de las citocinas TNF, IL-6, IL-4, TGF- β , IL-2, VEGF y CCL2. (Ver Figura 22)

9.-CONCLUSIÓN

El LPI cumple con los criterios necesarios para ser considerado un patrón molecular asociado a homeostasis (HAMP) en las células cebadas.

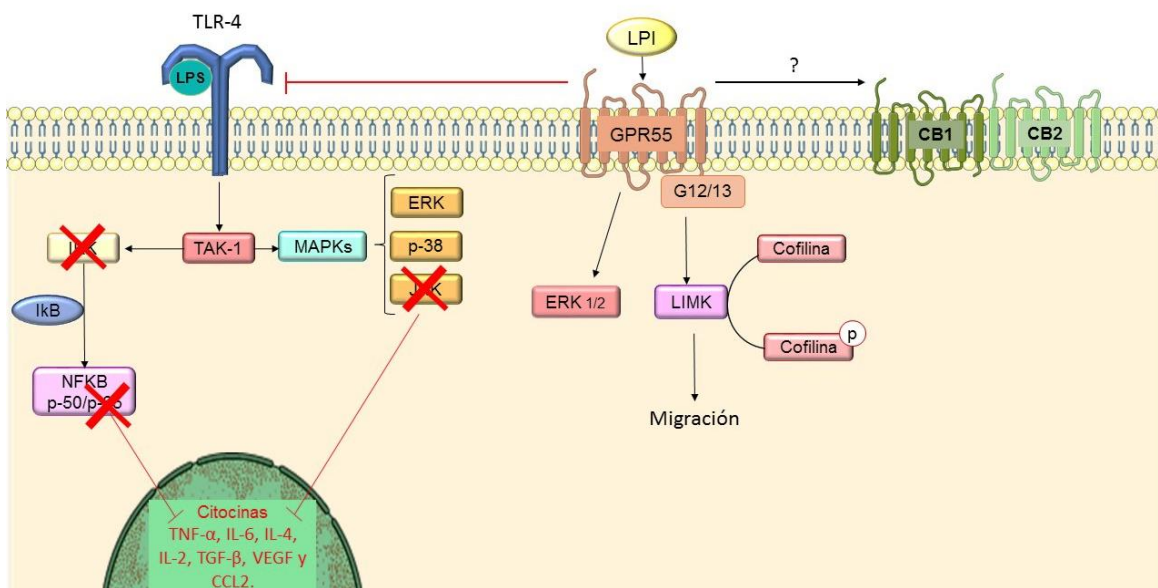


Figura 22. El LPI como HAMP de las CCs. Efectos del LPI en las CCs, en condiciones fisiológicas induce la activación de ERK y proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina (LIMK y cofilina). Estas últimas, inducen cambios necesarios que le permiten a la célula migrar. También se observan los efectos inhibitorios del LPI en el sistema de transducción de señales del TLR-4 y en la síntesis del mRNA de diferentes citocinas. La participación de los receptores a cannabinoides (CB1 y CB2) tendrá que ser descartada en experimentos futuros.

10.-PERSPECTIVAS

Nuestros hallazgos abren la puerta a nuevos experimentos que nos permitan ampliar el conocimiento del LPI en nuestro modelo celular. Algunos puntos por considerar son:

- Determinar la participación del GPR55 u otros receptores involucrados (CB1, CB2, GPR18) en los efectos observados con LPI, con aproximaciones farmacológicas utilizando antagonistas de estos receptores (AM251, AM630 y PBS) o por técnicas de biología molecular como siRNAs para los receptores involucrados (GPR55, CB1, CB2 y GPR18).
- Determinar si las CCs son productoras de LPI. Para este fin, se puede determinar la actividad de enzimas involucradas en la síntesis del lípido o bien analizar el sobrenadante de un cultivo celular y cuantificar la concentración del LPI.
- Investigar el significado funcional de la activación de ERK 1/2 o p-65 inducida por el LPI en CCs. Por ejemplo, se podrían estudiar los efectos de ERK1/2 en la activación de CREB y su papel en la proliferación celular.
- Investigar el mecanismo por el cual el binomio LPI/GPR55 interactúa con el sistema de señalización del TLR4. En este punto se tendrá que estudiar si el LPI modifica la expresión del TLR4 usando técnicas de biología molecular. Para investigar proteínas que puedan interactuar con la vía del TLR4 se pueden usar agonistas o antagonistas de ciertas proteínas como Rho o ROCK, GRKs, β -arrestinas o GRPs, y, una vez localizado el punto de interacción, realizar ensayos de co-localización o co-inmunoprecipitación. Adicionalmente se tendrá que descartar la participación del dímero entre el GPR55 y el CB2, antes reportado en las acciones del LPI.
- Comprobar si en modelos de inflamación in vivo se reproducen los efectos inhibitorios del LPI sobre el TLR4, tanto en animales WT como en animales carentes de CCs para valorar la participación de este tipo celular en alguna respuesta sistémica al LPS. Se puede realizar un modelo de inflamación

aguda y crónica inyectando LPS intraperitoneal y analizar, tanto la concentración del LPI como sus efectos en el sistema del TLR4.

- Dada la relevancia de la participación del LPI y CCs en procesos inflamatorios crónicos de tipo oncológico, también sería interesante estudiar los efectos de este lípido en migración y sus efectos como HAMP en un modelo *in vivo* de melanoma, el cual ya se encuentra estandarizado en nuestro laboratorio.

11.-BIBLIOGRAFIA

1. Ehrlich, P. Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. Arch. (1877). *Fuer Mikroskopische Anat.* 13, 263–278.
2. Wernersson, S., & Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature reviews. Immunology*, 14(7), 478–494.
3. Galli S, Nakae S, Tsai M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:135-142.
4. Kim, H. S., Kawakami, Y., Kasakura, K., & Kawakami, T. (2020). Recent advances in mast cell activation and regulation. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-196.
5. Gentek, R., Ghigo, C., Hoeffel, G., Bulle, M. J., Msallam, R., Gautier, G., Launay, P., Chen, J., Ginhoux, F., & Bajénoff, M. (2018). Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity*, 48(6), 1160–1171.e5.
6. Joakim S. Dahlin, Jenny Hallgren. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Molecular Immunology*, Volume 63, Issue 1, 2015, Pages 9-17, ISSN 0161-5890.
7. Kitamura, Y., Oboki, K., & Ito, A. (2007). Development of mast cells. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 83(6), 164–174
8. Grootens, J., Ungerstedt, J. S., Nilsson, G., & Dahlin, J. S. (2018). Deciphering the differentiation trajectory from hematopoietic stem cells to mast cells. *Blood Advances*, 2(17), 2273-2281.
9. Abraham, S. N., & St John, A. L. (2010). Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature reviews. Immunology*, 10(6), 440–452.
10. da Silva, E. Z., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 62(10), 698–738.
11. Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., & Wood, J. G. (2016). Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers in immunology*, 6, 620.
12. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Van Snick J, Strom TB, Zheng XX, Noelle RJ (2006). Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 442:997-1002.
13. Nautiyal KM, Dailey CA, Jahn JL, Rodriguez E, Son NH, Sweedler JV, Silver R (2012). Serotonin of mast cell origin contributes to hippocampal function. *Eur J Neurosci*.
14. Stelekati E, Bahri R, D’Orlando O, Orinska Z, Mittrücker HW, Langenhaun R, et al. (2009). Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8+ T cell effector functions. *Immunity* 31(4):665–76.
15. Moon, T. C., Befus, A. D., & Kulka, M. (2014). Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in immunology*, 5, 569.
16. Galli S, Lantz C (1999). Allergy. In Paul, W.E, F. Immunology., ed (Philadelphia: Lippincott-Raven Press), pp. 1137-1184

17. Justiz Vaillant AA, Zito PM. Immediate Hypersensitivity Reactions. [Updated 2020 Jan 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-.
18. Kraft, S., & Kinet, J. P. (2007). New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nature reviews. Immunology*, 7(5), 365–378.
19. Ortiz-Meza I, Pérez-Armendáriz LÁ, Amador-Robles M, et al. (2018). Polimorfismos del receptor FcεRI y su relación con enfermedades alérgicas. *Alerg Asma Inmunol Pediatr*;27(1):4-9.
20. Gasteiger, G., D'Oswaldo, A., Schubert, D. A., Weber, A., Bruscia, E. M., & Hartl, D. (2017). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *Journal of innate immunity*, 9(2), 111–125.
21. Palker, Thomas & Dong, Gang & Leitner, Wolfgang. (2009). Mast cells in innate and adaptive immunity to infection. *European journal of immunology*. 40. 13-8.
22. Taro Kawai, Shizuo Akira. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. Volume 34, Issue 5, Pages 637-650.
23. Durán, Anyelo, Álvarez-Mon, Melchor, & Valero, Nereida. (2014). Papel de los receptores tipo toll (TLRs) y receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs) en las infecciones virales. *Investigación Clínica*, 55(1), 61-81.
24. Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., & Ogawa, H. (2001). Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(4), 2250–2256.
25. Martin-Avila, Alejandro & González-Espinosa, Claudia. (2011). Signaling Through Toll-like Receptor 4 and Mast Cell-dependent Innate Immunity Responses. *IUBMB life*. 63. 922-9.
26. Wang, X., Li, Y. F., Nanayakkara, G., Shao, Y., Liang, B., Cole, L., Yang, W. Y., Li, X., Cueto, R., Yu, J., Wang, H., & Yang, X. F. (2016). Lysophospholipid Receptors, as Novel Conditional Danger Receptors and Homeostatic Receptors Modulate Inflammation-Novel Paradigm and Therapeutic Potential. *Journal of cardiovascular translational research*, 9(4), 343–359.
27. Espinosa-Riquer, Zyanya & Ibarra, Alfredo & Vibhushan, Shamila & Bratti, Manuela & Charles, Nicolas & Blank, Ulrich & Rodríguez-Manzo, Gabriela & González-Espinosa, Claudia. (2019). TLR4 Receptor Induces 2-AG-Dependent Tolerance to Lipopolysaccharide and Trafficking of CB2 Receptor in Mast Cells. *The Journal of Immunology*. 202. j1800997.
28. Huang, B., Lei, Z., Zhang, G. M., Li, D., Song, C., Li, B., ... Feng, Z. H. (2008). SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. *Blood*, 112(4), 1269–1279.

29. Silverman, A. J., Sutherland, A. K., Wilhelm, M., & Silver, R. (2000). Mast cells migrate from blood to brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(1), 401–408.
30. Lambert, M. W. (2019). Cytoskeletal and nucleoskeletal interacting protein networks play critical roles in cellular function and dysfunction. *Experimental Biology and Medicine*, 244(15), 1233–1239
31. Fletcher, DA, Mullins, RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010; 463:485–92
32. Hohmann, T., & Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4), 362.
33. Amos, Linda. (2005). Tubulin and Microtubules. 10.1038/npg.els.0003890.
34. Muroyama, A., & Lechler, T. (2017). Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development (Cambridge, England)*, 144(17), 3012–3021.
35. Tang, Dale & Gerlach, Brennan. (2017). The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respiratory Research*.
36. Dráber, P., Sulimenko, V., & Dráberová, E. (2012). Cytoskeleton in mast cell signaling. *Frontiers in immunology*, 3, 130.
37. Carlsson A. E. (2010). Actin dynamics: from nanoscale to microscale. *Annual review of biophysics*, 39, 91–110.
38. Steven J. Winder, Kathryn R. Ayscough. Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science* 2005 118: 651-654
39. Bravo-Cordero, J. J., Magalhaes, M. A., Eddy, R. J., Hodgson, L., & Condeelis, J. (2013). Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(7), 405–415.
40. Chugh, P., & Paluch, E. K. (2018). The actin cortex at a glance. *Journal of cell science*, 131(14), jcs186254.
41. De Ieso, Michael & Yool, Andrea. (2018). Mechanisms of Aquaporin-Facilitated Cancer Invasion and Metastasis. *Frontiers in Chemistry*. 6. 10.3389/fchem.2018.00135.
42. Anne J. Ridley. Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science* 2001 114: 2713-2722.
43. Liu J, Wada Y, Katsura M, Tozawa H, Erwin N, Kapron CM, Bao G, Liu J. Rho-Associated Coiled-Coil Kinase (ROCK) in Molecular Regulation of Angiogenesis. *Theranostics* 2018; 8(21):6053-6069.
44. Halova, I., Draberova, L., & Dráber, P. (2012). Mast Cell Chemotaxis – Chemoattractants and Signaling Pathways. *Front. Immun.*
45. Evans, Jilly & Hutchinson, John. (2010). Seeing the future of bioactive lipid drug targets. *Nature chemical biology*. 6. 476-9.
46. Chiurchiù, V., & Maccarrone, M. (2016). Bioactive lipids as modulators of immunity, inflammation and emotions. *Current Opinion in Pharmacology*, 29, 54–62

47. Hugh Rosen, Pedro J. Gonzalez-Cabrera, M. Germana Sanna, Steven Brown. (2009). Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling. *Annual Review of Biochemistry* 78:1, 743-768
48. Tsai, H., Han, M.H. (2016). Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway: Therapeutic Targets in Autoimmunity and Inflammation. *Drugs* 76, 1067–1079
49. Megan Price, Carole Oskeritzian, Sheldon Milstien & Sarah Spiegel (2008). Sphingosine-1-phosphate synthesis and functions in mast cells, *Future Lipidology*, 3:6, 665-674
50. Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, et al. (2004). Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med* 199(7):959–70
51. Jenne CN, Enders A, Rivera R, Watson SR, Bankovich AJ, Pereira JP, Xu Y, Roots CM, Beilke JN, Banerjee A, Reiner SL, Miller SA, Weinmann AS, Goodnow CC, Lanier LL, Cyster JG, Chun J. (2009). T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J Exp Med*. 206:2469–2481.
52. Konig K, Diehl L, Rommerscheidt-Fuss U, Golletz C, Quast T, Kahl P, Kolanus W, Knolle P, Buettner R, Heukamp LC. (2010). Four-and-a-half LIM domain protein 2 is a novel regulator of sphingosine 1-phosphate receptor 1 in CCL19-induced dendritic cell migration. *J Immunol*. 185:1466–1475.
53. Rathinasamy A, Czeloth N, Pabst O, Forster R, Bernhardt G. (2010) The origin and maturity of dendritic cells determine the pattern of sphingosine 1-phosphate receptors expressed and required for efficient migration. *J Immunol*. 185:4072–4081.
54. Schwab SR, Cyster JG. (2007). Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol*. 8:1295–1301.
55. Zachariah MA, Cyster JG. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science*. 2010;328:1129–1135.
56. Sinha RK, Park C, Hwang IY, Davis MD, Kehrl JH. (2009). B lymphocytes exit lymph nodes through cortical lymphatic sinusoids by a mechanism independent of sphingosine-1-phosphate-mediated chemotaxis. *Immunity*. 30:434–446.
57. Olivera A, Rivera J. (2011). An emerging role for the lipid mediator sphingosine-1-phosphate in mast cell effector function and allergic disease. *Adv Exp Med Biol* 716:123–42
58. Saluja, R., Kumar, A., Jain, M., Goel, S. K., & Jain, A. (2017). Role of Sphingosine-1-Phosphate in Mast Cell Functions and Asthma and Its Regulation by Non-Coding RNA. *Frontiers in immunology*, 8, 587.
59. Tsuyoshi Nishi, Naoki Kobayashi, Yu Hisano, Atsuo Kawahara, Akihito Yamaguchi. (2014). Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. *Molecular and Cell Biology of Lipids*, Volume 1841, Issue 5, Pages 759-765, 1388-1981.

60. Alhouayek, Mireille et al. (2018). Lysophosphatidylinositols, from Cell Membrane Constituents to GPR55 Ligands. *Trends in Pharmacological Sciences*, Volume 39, Issue 6, 586 – 604
61. Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T. (2009). 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem*; 145:13–20
62. Atsushi Yamashita, Saori Oka, Takashi Tanikawa, Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki, Takayuki Sugiura. (2013). The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, Volume 107, pages 103-116.
63. Piñeiro R, Maffucci T, Falasca M. (2011). The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene*; 30:142–52.
64. Zhou, X. L., Guo, X., Song, Y. P., Zhu, C. Y., & Zou, W. (2018). The LPI/GPR55 axis enhances human breast cancer cell migration via HBXIP and p-MLC signaling. *Acta pharmacologica Sinica*, 39(3), 459–471
65. Kargl, J. et al. (2016) GPR55 promotes migration and adhesion of colon cancer cells indicating a role in metastasis. *Br. J. Pharmacol.* 173, 142–154
66. N.A. Hofmann, J. Yang, S.A. Trauger, H.Nakayama, L. Huang, D. Strunk, et al. (2015). The GPR55 agonist, L-alpha-lysophosphatidylinositol, mediates ovarian carcinoma cell-induced angiogenesis *Br. J. Pharmacol.*, 172 , pp. 4107-4118
67. Xiao, Y., Chen, Y., Kennedy, A.W., Belinson, J. and XU, Y. (2000), Evaluation of Plasma Lysophospholipids for Diagnostic Significance Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) Analyses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 905: 242-259
68. Masquelier J, Alhouayek M, Terrasi R, Bottemanne P, Paquot A, Muccioli G. (2018) Lysophosphatidylinositols in inflammation and macrophage activation: Altered levels and anti-inflammatory effects, *Molecular and Cell Biology of Lipids*, volume 1863, Issue 12, Pages 1458-1468, ISSN 1388-1981
69. Moreno-Navarrete, J.M. et al. (2012) The L-alpha-lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes* 61, 281–291
70. Sutphen R, Xu Y, Wilbanks GD, et al. Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(7):1185-1191
71. F. Maingret, A.J. Patel, F. Lesage, M. Lazdunski, E. Honore, (2000). Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK, *J. Biol. Chem.* 275:10128–10133.
72. Balenga, N., Aflaki, E., Kargl, J. et al. (2011). GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res* 21, 1452–1469
73. Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M. et al. (2018). Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 638–653

74. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*. May;252(5007):802-808.
75. Kozasa, T., Hajicek, N., Chow, C. R., & Suzuki, N. (2011). Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *Journal of biochemistry*, 150(4), 357–369.
76. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*; 64:193–198.
77. Drmota, T.; Greasley, P.; Groblewski, T. (2004) Screening assays for cannabinoid-ligand type modulators of GPR55. Astrazeneca, USA.
78. Ryberg, E. et al. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 152, 1092–1101
79. Frederick J. Ehlert. Chapter Five - Analysis of Biased Agonism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Academic Press. Volume 160. 2018. Pages 63-104.
80. Liu, Bo & Song, Shuang & Jones, Peter & Persaud, Shanta. (2014). GPR55: From Orphan to Metabolic Regulator?. *Pharmacology & therapeutics*. 145. 10.1016/j.pharmthera.2014.06.007.
81. Vogt, S. et al. (2003) Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13- deficient cells: genetic evidence for an involvement of Gq/G11. *J. Biol. Chem.* 278, 28743–28749
82. Marco Falasca, Riccardo Ferro. (2016). Role of the lysophosphatidylinositol/GPR55 axis in cancer. *Advances in Biological Regulation*. Volume 60, Pages 88-93.
83. K. Mikoshiba. (2015), Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv. Biol. Regul.*, 57 pp. 217-227
84. S. Danthi, J.A. Enyeart, J.J. Enyeart, (2003). Modulation of native TREK-1 and Kv1.4 K⁺ channels by polyunsaturated fatty acids and lysophospholipids, *J. Membr. Biol.* 195 147–164.
85. A.J. Patel, M. Lazdunski, E. Honore, (2001). Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 422–428
86. G. Ben-Zeev, M. Teliás, I. Nussinovitch, (2010). Lysophospholipids modulate voltagegated calcium channel currents in pituitary cells; effects of lipid stress, *Cell Calcium* 47 514–524.
87. M.T. Ma, J.F. Yeo, A.A. Farooqui, J. Zhang, P. Chen, W.Y. Ong, (2010). Differential effects of lysophospholipids on exocytosis in rat PC12 cells, *J. Neural Transm.* 117 301–308.
88. Bondarenko, M. Waldeck-Weiermair, S. Naghdi, M. Poteser, R. Malli, W.F. Graier, (2010). GPR55-dependent and -independent ion signalling in response to lysophosphatidylinositol in endothelial cells, *Br. J. Pharmacol.* 161308–320.
89. S. Lenzen, J.K. Gorlich, I. Rustenbeck, Regulation of transmembrane ion transport by reaction products of phospholipase A2. I. (1989). Effects of lysophospholipids on mitochondrial Ca²⁺ transport, *Biochim. Biophys. Acta* 982 140–146.

90. Robertson-Gray, OJ, Walsh, SK, Ryberg, E, Jönsson-Rylander, A-C, Lipina, C, Wainwright, CL. I- α -Lysophosphatidylinositol (LPI) aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury via a GPR55/ROCK-dependent pathway. *Pharmacol Res Perspect*. 2019;
91. Schicho, R., Bashashati, M., Bawa, M., McHugh, D., Saur, D., Hu, H. M., Zimmer, A., Lutz, B., Mackie, K., Bradshaw, H. B., McCafferty, D. M., Sharkey, K. A., & Storr, M. (2011). The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflammatory bowel diseases*, 17(8), 1651–1664.
92. Sisay, S. et al. (2013) Genetic background can result in a marked or minimal effect of gene knockout (GPR55 and CB2 receptor) in experimental autoimmune encephalomyelitis models of multiple sclerosis. *PLoS One* 8, e76907
93. Xu, Y. et al. (2001) The role and clinical applications of bioactive lysolipids in ovarian cancer. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 8, 1–13
94. Brown, A.; Wise, A. (2001). Identification of modulators of GPR55 activity. USPTO; WO0186305, GlaxoSmithKline
95. Sharir, H., & Abood, M. E. (2010). Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacology & therapeutics*, 126(3), 301–313
96. Henstridge, C. M., Balenga, N. A., Schröder, R., Kargl, J. K., Platzer, W., Martini, L., Arthur, S., Penman, J., Whistler, J. L., Kostenis, E., Waldhoer, M., & Irving, A. J. (2010). GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *British journal of pharmacology*, 160(3), 604–614
97. Ramírez-Valadez, K.A., Vázquez-Victorio, G., Macías-Silva, M. and González-Espinosa, C. (2017), Fyn kinase mediates cortical actin ring depolymerization required for mast cell migration in response to TGF- β in mice. *Eur. J. Immunol.*, 47: 1305-1316.
98. Cruz, S. L., Sánchez-Miranda, E., Castillo-Arellano, J. I., Cervantes-Villagrana, R. D., Ibarra-Sánchez, A., & González-Espinosa, C. (2018). Anandamide inhibits Fc ϵ RI-dependent degranulation and cytokine synthesis in mast cells through CB₂ and GPR55 receptor activation. Possible involvement of CB₂-GPR55 heteromers. *International immunopharmacology*, 64, 298–307.
99. S. Meurer, M. Neb; S. Weiskirchen; P.Kim; C. Tag; M. Kauffmann; M. Huber; y R. Weiskirchen. Isolation of Mature (peritoneum.Deroved) Mast Cells and Immature (BMCCs) precursors from Mice. 2016. *PLoS ONE* 11(6).
100. Madera-Salcedo IK, Cruz SL, Gonzalez-Espinosa C. Morphine prevents lipopolysaccharide-induced TNF secretion in mast cells blocking I κ B kinase activation and SNAP-23 phosphorylation: correlation with the formation of a β -arrestin/TRAF6 complex. *J Immunol*. 2013;191(6):3400-3409.
101. Chen, Hong-Chen. (2005). Boyden Chamber Assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 294. 15-22. 10.1385/1-59259-860-9:015

102. Gaudenzio, N., Sibilano, R., Marichal, T., Starkl, P., Reber, L. L., Cenac, N., McNeil, B. D., Dong, X., Hernandez, J. D., Sagi-Eisenberg, R., Hammel, I., Roers, A., Valitutti, S., Tsai, M., Espinosa, E., & Galli, S. J. (2016). Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. *The Journal of clinical investigation*, 126(10), 3981–3998.
103. Prieschl, E. E., Csonga, R., Novotny, V., Kikuchi, G. E., & Baumruker, T. (1999). The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after Fc epsilon receptor I triggering. *The Journal of experimental medicine*, 190(1), 1–8.
104. Goth, A., Adams, H. R., & Knoohuizen, M. (1971). Phosphatidylserine: selective enhancer of histamine release. *Science (New York, N.Y.)*, 173(4001), 1034–1035.
105. Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., & Sugiura, T. (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 362(4), 928–934.
106. Wen, A. Y., Sakamoto, K. M., & Miller, L. S. (2010). The role of the transcription factor CREB in immune function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(11), 6413–6419.
107. Strohlic, Laure & Dwivedy, Asha & Horck, Francisca & Falk, Julien & Holt, Christine. (2008). A role for S1P signalling in axon guidance in the *Xenopus* visual system. *Development (Cambridge, England)*. 135. 333-42. 10.1242/dev.009563.
108. Xiang, S. Y., Ouyang, K., Yung, B. S., Miyamoto, S., Smrcka, A. V., Chen, J., & Heller Brown, J. (2013). PLC ϵ , PKD1, and SSH1L transduce RhoA signaling to protect mitochondria from oxidative stress in the heart. *Science signaling*, 6(306), ra108.
109. Whyte, L.S. et al. (2009) The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16511–16516
110. Ambach, A., Saunus, J., Konstandin, M., Wesselborg, S., Meuer, S. C., & Samstag, Y. (2000). The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *European journal of immunology*, 30(12), 3422–3431.
111. Olivera, A., Urtz, N., Mizugishi, K., Yamashita, Y., Gilfillan, A. M., Furumoto, Y., Gu, H., Proia, R. L., Baumruker, T., & Rivera, J. (2006). IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses. *The Journal of biological chemistry*, 281(5), 2515–2525.
112. McHugh, D., Hu, S. S., Rimmerman, N., Juknat, A., Vogel, Z., Walker, J. M., & Bradshaw, H. B. (2010). N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC neuroscience*, 11, 44.
113. Schicho, R., Bashashati, M., Bawa, M., McHugh, D., Saur, D., Hu, H. M., Zimmer, A., Lutz, B., Mackie, K., Bradshaw, H. B., McCafferty, D. M., Sharkey, K. A., & Storr, M. (2011). The atypical cannabinoid O-1602 protects

- against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflammatory bowel diseases*, 17(8), 1651–1664
114. Ashton J. C. (2012). The atypical cannabinoid O-1602: targets, actions, and the central nervous system. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 12(3), 233–239.
115. Saliba, S. W., Jauch, H., Gargouri, B., Keil, A., Hurrle, T., Volz, N., Mohr, F., van der Stelt, M., Bräse, S., & Fiebich, B. L. (2018). Anti-neuroinflammatory effects of GPR55 antagonists in LPS-activated primary microglial cells. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 322.
116. Jeremy D. Hill, Viviana Zuluaga-Ramirez, Sachin Gajghate, Malika Winfield, Uma Sriram, Slava Rom, Yuri Persidsky. Activation of GPR55 induces neuroprotection of hippocampal neurogenesis and immune responses of neural stem cells following chronic, systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, Volume 76, 2019, Pages 165-181
117. De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D. U., Jin, R., Jones, J., Cong, R. and Franzoso, G. (2001). Induction of gadd45 β by NF- κ B downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 414, 308-313
118. Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C, Franzoso G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 22):5197-5208.
119. Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1997). A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF α and cellular stresses. *EMBO J.* 16, 7045-7053
120. Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M. and Lin, A. (2001). Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes. *Nature* 414, 313-317.
121. Sakon, S, Xue, X., Takekawa, M., Sasazuki, T., Okazaki, T., Kojima, Y., Piao, J. H., Yagita, H., Okumura, K., Doi, T. et al. (2003). NF- κ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.* 22, 3898-3909
122. Jackson, S. K., Abate, W., Parton, J., Jones, S., & Harwood, J. L. (2008). Lysophospholipid metabolism facilitates Toll-like receptor 4 membrane translocation to regulate the inflammatory response. *Journal of leukocyte biology*, 84(1), 86–92.
123. Gruber, E., Heyward, C., Cameron, J., & Leifer, C. (2018). Toll-like receptor signaling in macrophages is regulated by extracellular substrate stiffness and Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK1/2). *International immunology*, 30(6), 267–278.
124. Konat, G. W., Krasowska-Zoladek, A., & Kraszpulski, M. (2008). Statins enhance toll-like receptor 4-mediated cytokine gene expression in astrocytes: implication of Rho proteins in negative feedback regulation. *Journal of neuroscience research*, 86(3), 603–609.
125. Borysiewicz, E., Fil, D., & Konat, G. W. (2009). Rho proteins are negative regulators of TLR2, TLR3, and TLR4 signaling in astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 87(7), 1565–1572.

126. Witherow, D. S., Garrison, T. R., Miller, W. E., Lefkowitz, R. J. (2004) β -Arrestin inhibits NF- κ B activity by means of its interaction with the NF- κ B inhibitor I κ B α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8603– 8607.
127. Aung, H. T., Schroder, K., Himes, S. R., Brion, K., van Zuylen, W., Trieu, A., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Hume, D. A., Sweet, M. J., Ravasi, T. (2006) LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. *FASEB J.* 20, 1315– 1327.
128. Lattin, Jane & Zidar, David & Schroder, Kate & Kellie, Stuart & Hume, David & Sweet, Matthew. (2007). G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *Journal of leukocyte biology.* 82. 16-32. 10.1189/jlb.0107051.
129. Fan, J., Malik, A. B. (2003) Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat. Med.* 9, 315– 321.
130. Morales-Martínez, A., Sánchez-Mendoza, A., Martínez-Lazcano, J. C., Pineda-Farías, J. B., Montes, S., El-Hafidi, M., Martínez-Gopar, P. E., Tristán-López, L., Pérez-Neri, I., Zamorano-Carrillo, A., Castro, N., Ríos, C., & Pérez-Severiano, F. (2017). Essential fatty acid-rich diets protect against striatal oxidative damage induced by quinolinic acid in rats. *Nutritional neuroscience*, 20(7), 388–395.
- Kaesler, S., Wölbing, F., Kempf, W. E., Skabytska, Y., Köberle, M., Volz, T., Sinnberg, T., Amaral, T., Möckel, S., Yazdi, A., Metzler, G., Schaller, M., Hartmann, K., Weide, B., Garbe, C., Rammensee, H. G., Röcken, M., & Biedermann, T. (2019). Targeting tumor-resident mast cells for effective anti-melanoma immune responses. *JCI insight*, 4(19), e125057.

V.- ANEXOS

V.I. Materiales

V.I.I Reactivos

Reactivo	Descripción General	Descripción Funcional	No. De Catálogo Y Proveedor	Vehículo
IgE (Ratón)	Anticuerpo monoclonal anti-dinitrofenol clona SPE7	IgE capaz de reconocer a un antígeno artificial compuesto por albúmina humana acoplada a dinitrofenol (DNP-HSA).	Sigma Aldrich #D8406	Agua MQ
Dinitrofenol unido a albúmina sérica humana (DNP-HSA)	Antígeno artificial reconocido por la IgE de la clona SPE7.	Activa al receptor FcεRI en células sensibilizadas con la IgE SPE7.	Sigma Aldrich #A6661	Agua MQ
Lipopolisacárido bacteriano (LPS)	Componente de la pared externa de <i>E. coli</i> , Serotipo 026:B6	Ligando del co-receptor CD14 y del Receptor Tipo Toll 4 (TLR-4)	Sigma Aldrich #L8274-100mg	Agua MQ
L-α - lisofosfatidilinositol (LPI), sal de sodio de glicina max (frijol de soya)	1-acil-sn-glicero-3-fosfo-(1-D-myo-inositol)	Agonista del receptor GPR55	Sigma Aldrich #L7635-1MG	70% Cloroformo, 27% Metanol y 3% Agua
O-1602	5-metil-4-[(1R,6R)-3-metil-6-(1-metiletanil)-2-ciclohexan-1-il]-1,3-benzenediol	Agonista selectivo del GPR55	Cayman Chemical #10006803	DMSO
ML-193	<i>N</i> -[4-[[[(3,4-Dimetil-5-isoxazolil)amino]sulfonil]fenil]-6,8-dimetil-2-(2-piridinil)-4-quinolinacarboxamida	Antagonista del GPR55	R&D Systems #4860/10	DMSO
AM251	1-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-	Agonista inverso del CB1	Sigma Aldrich #A6226	Etanol

	pirazol-3-carboxamida			
AM630	6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinyl)etil]-1 <i>H</i> -indol-3-il](4-metoxifenil)metanona	Agonista Inverso del CB2	Tocris Bioscience #1120	Etanol
Esfingosina-1-fosfato (S1P)	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-2-Amino-4-octadecen-1,3-diol 1-fosfato, D-eritro-esfingosina 1-fosfato	Agonista de los S1PRs	Sigam Aldrich #S9666	DMSO
Faloidina acoplada a Rodamina	Micotoxina acoplada a Isotiocianato de Tetrametilrodamina	Reconoce F-actina	Life Technologies # R415	Solución de Bloqueo
DAPI	4´6-diamino-2-fenilindol	Reconoce el DNA	Invitrogen #D1306	PBS 1X

V.I.II Anticuerpos

Anticuerpo	Especie	Sitio de reconocimiento	Tipo	Catálogo	Marca	Dilución
p-ERK 1/2	Conejo	Tyr 202/Tyr 204	Policlonal	9101	Cell Signaling	1:15,000
p-p65 NF-κB	Conejo	Ser 536 (9H1)	Monoclonal	3033	Cell Signaling	1: 5,000
p-IKKα/β	Conejo	Ser 176/180	Monoclonal	2697	Cell Signaling	1:5,000
p-LIMK	Conejo	Thr 508/505		28409-R	Santa Cruz Biotechnology	1:5,000
p-TAK1	Conejo	Thr 184/187	Policlonal	4531	Cell Signaling	1:5,000
p-p38	Conejo	Thr180/Tyr 182	Policlonal	9211	Cell Signaling	1:20,00
p-JNK	Conejo	Thr183/Tyr 185	Policlonal	9252	Cell Signaling	1:5,000
p-Cofilina	Conejo	Phospho Ser3	Monoclonal	3313	Cell Signaling	1:4,000
B-actina	ratón	C-terminal de la actina	Monoclonal	ACTBD1 1B7	Santa Cruz Biotechnology	1:15,000
Anticuerpo secundario	Conejo/ Ratón	Anticuerpos de conejo o Ratón	Monoclonal		Jackson ImmunoResearch	1:15,000

V.I.III Oligos

Citocina	UP	DOWN	No. De catálogo o referencia
IL-2	5'- TCAAGCTCCACT TCAAGCTCTACA GCGGAAG-3'	5'- GACAGAAGGCTA TCCATCTCCTCA GAAAGTCC-3'	Lofstrand Labs Limited GOIL2U
IL-4	5'- CCAGCTAGTTGT CATCCTGCTCTT CTTTCTCG-3'	5'- CAGTGATGTGGA CTTGGACTCATT CATGGTGC-3'	Lofstrand Labs Limited GOIL4D
IL-6	5'- ATGAAGTTCCTC TCTGCAAGAGAC T-3'	5'- CACTAGGTTGCC GAGTAGATCTC-3'	Lofstrand Labs Limited GOIL6D
TNF- α	5'- TTCTGTCTACTG AACTTCGGGGTG ATCGGTCC-3'	5'- GTATGAGATAGC AAATCGGCTGAC GGTGTGGG-3'	Lofstrand Labs Limited GOTNFAD
TGF- β 818	5'- CGCAACAACGCC ATCTATGAGAAA-3'	5'- TTGCAGGAGCGC ACAATCATGTTG-3'	
CCL2	5'- GTCACACTGGTC ACTCCTAC-3'	5'- AGAGAGCCAGAC GGAGGAAG-3'	Invitrogen custom primers
VEGF	5'- CTGCTCTCTTGG GTCCACTGG-3'	5'-CACCGCCTTGGC TTGTCACAT-3'	
GAPDH	5'- TGAAGGTCGGTG TGAACGGATTTG GC-3'	5'- CATGTAGGCCAT GAGGTCCACCAC- 3'	Lofstrand Labs Limited GOG3D