



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

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

“Participación del 2-araquidonoilglicerol (2-AG) en el desarrollo de la tolerancia al lipopolisacárido bacteriano (LPS) en células cebadas. Aproximaciones *in vitro* e *in vivo*”

Tesis que presenta:

M. en C. Zyanya Patricia Espinosa Riquer

Para obtener el Grado de:

**Doctora en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directoras de la Tesis:

Dra. Claudia González Espinosa

Dra. Gabriela Rodríguez Manzo

Este trabajo se realizó en los Laboratorios 11 y 18 del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav Sede Sur bajo la dirección de la Dra. Claudia González Espinosa y la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo gracias al apoyo de Conacyt a través de la beca de doctorado número 277991, de la beca mixta número 29212 y de los proyectos ANR-Conacyt 188565, Conacyt FC-1122 y Conacyt 220772.

A mis padres y hermana, por su infinito amor y apoyo

A Sergio, por ser mi compañero de vida

A mi Violeta, por iluminar todos mis días

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Claudia González Espinosa y la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo por recibirme en sus laboratorios y brindarme su apoyo, conocimientos y consejos. Gracias por la excelente dirección profesional y personal brindada durante toda la realización de mi trabajo de doctorado.

A los Doctores: Silvia Cruz Martín del Campo, Emilio Galván Espinosa, Vianney Ortiz Navarrete y Mario Cruz Muñoz porque sus excelentes aportaciones y apoyo constante enriquecieron esta tesis.

Al Dr. Ulrich Blank por recibirme en su laboratorio y contribuir de forma importante en la realización de este trabajo.

Al M. en C. y amigo Alfredo Ibarra Sánchez por su apoyo científico y moral durante toda mi estancia en el Laboratorio 11.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Fabiola, Karla, Elizabeth, Deisy, Rodolfo, Dulce, Jorge, Nancy, Jesabel, Itzel, Pablo y Frida porque sin todas las risas que pasamos juntos el trabajo no hubiera sido tan divertido, alentador y formativo.

A las que fueron mis compañeras durante mi estancia en París: Shamila y Manuela, por acogerme y apoyarme estando tan lejos de casa.

A todo el personal del Bioterio de Cinvestav Zacatenco y Sede Sur por su apoyo para el mantenimiento de las colonias de ratones utilizadas para la realización de esta tesis.

A todo el personal de limpieza, mantenimiento y seguridad de Cinvestav por hacer que nuestro lugar de trabajo siempre esté en las mejores condiciones.

A mi familia y amigos fuera de Cinvestav, por escuchar mis preocupaciones y acompañarme en todos los momentos durante mi transcurso por el doctorado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	V
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Las células cebadas (CC)	1
1.2 Las CC en la inmunidad innata	2
1.3 Receptores tipo Toll en CC.....	2
1.4 Activación y vía de señalización del receptor TLR4.....	3
1.4.1 Lipopolisacárido bacteriano	3
1.4.2 El receptor TLR4 y su activación por LPS.....	4
1.4.3 Vía de señalización del receptor TLR4	5
1.5 Modelos <i>in vivo</i> para el estudio de la respuesta al LPS	7
1.5.1 Modelo de endotoxemia por administración de LPS y CC	8
1.6 Desarrollo de tolerancia al LPS.....	9
1.6.1 Mecanismos moleculares que inducen el desarrollo de tolerancia	10
1.6.2 Mecanismos que regulan la TE de forma indirecta	11
1.7 El sistema endocannabinoide	14
1.7.1 Endocannabinoides (eCN).....	14
1.7.2 Receptores a eCN	15
1.7.3 Síntesis y degradación de eCN.....	16
1.8 Vías de señalización de los receptores a eCN	17
1.8.1 Vía dependiente de proteínas G	17
1.8.2 Vía independiente de proteínas G	18
1.9 Funciones del sistema eCN a nivel central	19
1.10 Funciones del sistema eCN a nivel periférico.....	20
1.10.1 Funciones de los eCN en el sistema inmune	21

1.10.2	eCN y CC	23
1.11	Tráfico vesicular de los GPCRs	24
1.11.1	Endocitosis de GPCRs	24
1.11.2	Proteínas que participan en el tráfico vesicular de los GPCRs	25
1.12	Tráfico vesicular del receptor CB₂	29
2	JUSTIFICACIÓN	30
3	HIPÓTESIS	30
4	OBJETIVO GENERAL	30
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
6	MATERIAL Y MÉTODOS	31
6.1	Metodología	31
6.1.1	Animales	31
6.1.2	Sustancias, reactivos y anticuerpos	32
6.1.3	Obtención y cultivo de CC de origen murino	33
6.1.4	Citometría de flujo	33
6.2	Parámetros evaluados	34
6.2.1	Ensayo de desgranulación de BMMCs	34
6.2.2	RT-PCR	35
6.2.3	Western Blot	37
6.2.4	ELISA	38
6.2.5	Inmunofluorescencia	38
6.2.6	Reconstitución de ratones deficientes de células cebadas	39
6.2.7	Obtención de lavados peritoneales	40
6.3	Diseño experimental	40
6.3.1	Análisis del establecimiento de tolerancia con 2-AG	40
6.3.2	Análisis de la expresión de los receptores a cannabinoides	41
6.3.3	Análisis de la fosforilación de proteínas en respuesta al 2-AG	41

6.3.4	Análisis del efecto de los antagonistas de los receptores CB ₁ y CB ₂ en el establecimiento de la tolerancia por 2-AG	41
6.3.5	Análisis de la secreción de 2-AG en respuesta al LPS	42
6.3.6	Análisis de la inhibición en la fosforilación de proteínas	42
6.3.7	Análisis de la expresión de marcadores de tolerancia	42
6.3.8	Análisis del efecto del inhibidor de SHIP sobre la secreción de TNF α	43
6.3.9	Análisis de la co-localización de proteínas con el receptor CB ₂	43
6.3.10	Análisis del efecto de 2-AG <i>in vivo</i>	43
6.4	Análisis estadístico	44
7	RESULTADOS	44
7.1	El 2-AG induce tolerancia a la endotoxina de manera similar al LPS	44
7.2	Las BMMCs expresan a los receptores a cannabinoides CB₁ y CB₂.....	45
7.3	Los receptores CB₁ y CB₂ en BMMCs son funcionales	46
7.4	El efecto inhibitorio del 2-AG en la secreción de TNFα inducida por LPS es dependiente del receptor CB₂	47
7.5	La estimulación con LPS induce la secreción de 2-AG y este efecto es dependiente del receptor TLR4.....	48
7.6	El 2-AG inhibe la fosforilación de IKK y NFκB, pero no inhibe la fosforilación de ERK y p38 estimulada por LPS.....	49
7.7	La estimulación con 2-AG induce la expresión de SHIP y de IRAK-M.....	52
7.8	La inhibición en la secreción de TNFα a tiempos cortos por 2-AG no depende de la expresión de SHIP	54
7.9	Los receptores CB₂ se encuentran localizados en regiones intracelulares en las BMMCs	55
7.10	La localización intracelular del receptor CB₂ no cambia con la adición de dinasore	56

7.11	La estimulación de BMMCs con LPS induce el tráfico vesicular del receptor CB ₂	57
7.12	El 2-AG inhibe la secreción de TNF α inducida por LPS <i>in vivo</i>	63
8	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	64
9	CONCLUSIONES	75
10	PERSPECTIVAS	76
	ANEXO I	77
	ANEXO II	80
	ANEXO III	82
	BIBLIOGRAFÍA.....	84

ABREVIATURAS

β -arr	Beta arrestina
2-AG	2-araquidonoilglicerol
3-AC	3 alfa-Aminocolestano
ABDH	Hidrolasas alfa/beta
AC	Adenilato ciclase
AEA	Araquidonoil etanolamina/ Anandamida
ALIA	Antagonismo de la inflamación por autacoides locales
ANOVA	Análisis de varianza
AP-1	Proteína activadora 1
BCL	Proteína codificada en el linfoma de células B
BMDCs	Células cebadas derivadas de médula ósea
BSA	Albúmina sérica bovina
CAMKII	Cinasa de calcio/calmodulina
cAMP	AMP cíclico
CB ₁	Receptor cannabinoide tipo 1
CB ₂	Receptor cannabinoide tipo 2
CC	Células cebadas
CD14	Grupo de diferenciación 14
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DAPI	4',6 diamino-2-2 fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP-HSA	Dinitrofenol acoplado a albúmina sérica humana
DSE	Inhibición de la excitación inducida por despolarización
DSI	Supresión de la inhibición inducida por despolarización
eCN	Endocannabinoides
EEA-1	Autoantígeno de endosomas tempranos

ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
FAAH	Amida hidrolasa de ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
FcεRI	Receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GDP	Difosfato de guanina
GEFs	Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GRK	Cinasa de receptores acoplados a proteínas G
GTP	Trifosfato de guanina
HEK293	Células embrionarias de riñón humano 293
IFNβ	Interferon beta
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IKK	Cinasa de IκB
IL	Interleucina
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina 1
IRAK-M	Cinasa inactiva asociada al receptor de interleucina 1
IRF	Factor regulador de interferon
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
LAMP	Proteína asociada a la membrana de lisosomas
LaNSE	Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales
LBP	Proteína de unión al LPS
LPS	Lipopolisacárido
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microorganismos
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MD-2	Proteína de diferenciación mieloide 2
MEK	Proteína cinasa cinasa activada por mitógenos

NAES	N-aciletanolaminas
NF κ B	Factor nuclear kappa B
NLR	Receptor tipo NOD
NOX	NADPH oxidasa
p-NAG	p-nitrofenil-beta-D-2-acetamido-2-desoxiglucopiranósido
PBS	Buffer salino de fosfatos
PEA	Palmitoiletanolamina
PFA	Paraformaldehído
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PI3K	Cinasa del fosfoinositol 3
PIP ₂	Fosfatidil inositol difosfato
PIP ₃	Fosfatidil inositol trifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PPAR	Receptores activados por el proliferador de peroxisomas
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PVDF	Polifluoruro de polivinilideno
RE	Retículo endoplásmico
RIP-1	Proteína serina/treonina de interacción con receptor
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
SCF	Factor de células troncales
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sodio-electroforesis en gel de poliacrilamida
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasa del retículo sarcoplásmico/endoplásmico
SHIP	Fosfatasa de inositol que contiene un dominio SH2
SNC	Sistema nervioso central
SOCS	Supresor de señalización de citocinas
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción

TAK1	Cinasa asociada a Tat
TBE	Buffer de Tris-Borato-EDTA
TBK1	Cinasa de unión a TANK
TBS-T	Buffer Tris salino y Tween 20
TE	Tolerancia a la endotoxina
TGN	Red trans-Golgi
TIR	Dominio de homología al receptor Toll/interleucina 1
TLR	Receptor tipo Toll
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF3	Factor 3 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRAM	Adaptador molecular relacionado con TRIF
TRIF	Adaptador que contiene un dominio TIR que induce interferon beta
TRPA1	Receptor de potencial transitorio A1
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1
WGA	Aglutinina de germen de trigo
WT	Cepa de tipo silvestre

RESUMEN

Las células cebadas (CC) contribuyen a la homeostasis de los tejidos controlando las reacciones inflamatorias locales que son desencadenadas por estímulos tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa. Aunque se ha descrito que las CC desarrollan un estado de hiporrespuesta al lipopolisacárido bacteriano (LPS, endotoxina) también conocido como tolerancia a la endotoxina (TE) después de la estimulación prolongada del receptor TLR4, los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno en CC no han sido completamente dilucidados. Por otro lado, se sabe que los endocannabinoides (eCN) son reguladores negativos de algunas respuestas inmunes actuando en distintos tipos celulares que incluyen a las CC. Por esta razón, se analizó el papel del eCN, 2-araquidonoilglicerol (2-AG), y de los receptores a cannabinoides CB₁ y CB₂, en el establecimiento de la TE en CC de médula ósea murina (BMMCs). En esta tesis se encontró que el 2-AG es capaz de inducir tolerancia al LPS y que este efecto pudo prevenirse al antagonizar al receptor CB₂ más no al receptor CB₁. Además, la adición de LPS a las BMMCs indujo la producción de 2-AG de forma dependiente del receptor TLR4, ya que este efecto no fue observado en BMMCs derivadas de ratones TLR4^{-/-}. Los mecanismos moleculares asociados al desarrollo de TE por 2-AG incluyeron el bloqueo de la fosforilación de IKK y NFκB inducida por la activación del receptor TLR4 y la producción de marcadores de tolerancia como SHIP-1 e IRAK-M. Por otro lado, el LPS promovió el tráfico vesicular del receptor CB₂ en vesículas positivas para Rab-11, Rab-7 y LAMP-2, indicando reciclamiento y degradación del receptor. Finalmente, el 2-AG previno la secreción de TNFα inducida por LPS *in vivo* en un modelo de endotoxemia y dependiente de CC. En conclusión, nuestros resultados muestran que el LPS promueve la síntesis de 2-AG, el cual, de forma autocrina, es capaz de activar a los receptores CB₂ los cuales se encontraron asociados a las vías de reciclamiento lento y de degradación. Además, el 2-AG promueve la síntesis de reguladores negativos de la vía de señalización del TLR4, contribuyendo al establecimiento de la TE y atenuando las respuestas innatas dependientes de CC *in vivo*.

ABSTRACT

Mast cells (MC) contribute to tissue homeostasis by controlling local inflammatory reactions triggered by stimuli from the adaptive and the innate immune systems. Although it is known that MC become hyporesponsive after a long-term activation of Toll-like receptor (TLR)4 by bacterial lipopolysaccharide (LPS, endotoxin), the molecular mechanisms involved in the induction of endotoxin tolerance (ET) in MC are not fully understood. On the other hand, recent evidence showing that endocannabinoids (eCN) can regulate inflammatory responses at the level of both the innate and adaptive immunity has been obtained. In the present work, we analyzed the role played by the eCN 2-araquidonoyl-glycerol (2-AG) and the CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors in the establishment of ET in murine bone marrow-derived mast cells (BMMCs). We found that a CB₂, but not a CB₁ cannabinoid receptor antagonist prevented the development of ET in MC. Addition of LPS to BMMCs caused the production of 2-AG in a TLR4-dependent fashion, since the phenomenon was not observed in cells derived from TLR4^{-/-} mice. Exogenous 2-AG induced ET similarly to LPS, blocking the TLR4-dependent phosphorylation of IKK and the p65 subunit of NFκB and inducing the synthesis of molecular markers of ET such as SHIP-1 and IRAK-M. LPS caused CB₂ receptor trafficking in Rab11, Rab7 and LAMP2- positive vesicles indicating recycling and degradation of the receptor. Finally, 2-AG prevented LPS-induced TNFα secretion *in vivo* in a MC-dependent model of endotoxemia. Our results show that LPS promotes the synthesis of 2-AG that activates CB₂ receptors, which are internalized by the slow endosomal recycling pathway and promotes the synthesis of negative regulators of the TLR4 signaling cascade, contributing to the establishment of ET that attenuates MC-dependent innate immunity responses *in vivo*.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Las células cebadas (CC)

Las CC se derivan de progenitores hematopoyéticos que circulan en la sangre como células inmaduras y, posteriormente, migran a tejidos vascularizados en donde completan su maduración gracias a la acción del factor de células troncales (SCF, por sus siglas en inglés) y de otras citocinas secretadas por células endoteliales y fibroblastos. Una vez maduras, estas células se caracterizan por contener una gran cantidad de gránulos electrodensos en su citoplasma (50-200 por célula), y por secretar una gran variedad de mediadores inflamatorios como histamina, heparina, diversas citocinas, sulfato de condroitina y varias proteasas (**Figura 1**) (Mukai et al. 2018; Krystel-Whittemore et al. 2016) a diferentes tiempos y por diversas vías (Blank et al. 2014; Xu et al. 2018).

Las CC presentan diferentes características fenotípicas dependiendo del tejido y las condiciones microambientales en donde se encuentren. De esta manera, estas células pueden presentar distinta susceptibilidad a su activación por diferentes estímulos, cambios en su capacidad para producir diferentes mediadores inflamatorios y alteraciones en la magnitud de sus respuestas secretoras a un estímulo determinado (Moon et al. 2010).

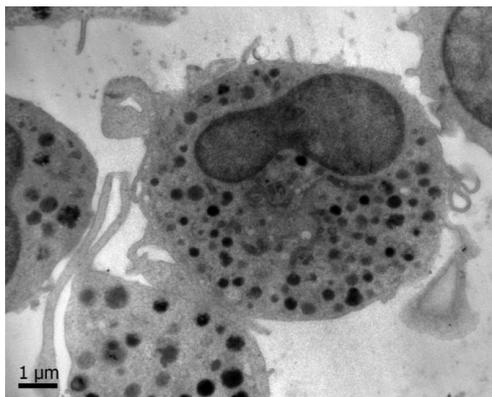


Figura 1. Micrografía de CC. La imagen muestra una CC en donde se observa el núcleo, los gránulos electrodensos y la membrana plasmática con algunas prolongaciones.
(Imagen del Laboratorio 11 tomada por Alfredo Ibarra Sánchez).

1.2 Las CC en la inmunidad innata

Las CC han sido mayormente estudiadas por su papel en las alergias mediadas por IgE, a través de la activación del receptor FcεRI, y por su participación en la inmunidad contra parásitos. En fechas más recientes, se ha descrito que también juegan un rol muy importante en la defensa contra bacterias y virus. Estas células actúan como centinelas inmunes al estar localizadas en sitios que les permiten ser de las primeras en entrar en contacto con patógenos junto con otros tipos celulares, como las células dendríticas y los macrófagos (St. John & Abraham 2013). Dependiendo del estímulo que las activa, las CC pueden secretar una gran cantidad de mediadores inflamatorios específicos para el tipo de patógeno que es detectado. Estos mediadores pueden proceder de los gránulos citoplasmáticos de las células (como la heparina, proteasas, el factor de necrosis tumoral alfa o TNFα e histamina), pueden ser sintetizados *de novo* en respuesta a la transcripción de genes (como las citocinas, quimiocinas y diversos factores angiogénicos y de crecimiento), o pueden ser sintetizados en respuesta a la activación de enzimas que se encuentran cerca de la membrana plasmática, (como los leucotrienos y prostaglandinas) (St. John & Abraham 2013). Las CC tienen la capacidad de reconocer diferentes patógenos mediante la detección de los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs por sus siglas en inglés), debido a que expresan diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) como receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs) y receptores de la familia RIG-I, entre otros (Sandig & Bulfone-Paus 2012; St. John & Abraham 2013). Dentro de estos receptores de la inmunidad innata, los TLRs han sido los más estudiados en las CC.

1.3 Receptores tipo Toll en CC

Los TLRs son una familia de receptores que reconocen una cantidad amplia y variada de MAMPs y, actualmente, se sabe que también pueden reconocer moléculas endógenas que se expresan en respuesta al daño tisular agudo o a enfermedades crónico-degenerativas (Kawai & Akira 2010). Aunque se ha descrito la existencia de 13 TLRs en ratones, en CC sólo se ha detectado la expresión de los TLRs-1-4 y 6-9, al

menos a nivel del RNAm (Sandig & Bulfone-Paus 2012). Los TLRs están localizados en la superficie celular o en compartimentos intracelulares, como el retículo endoplásmico (RE), endosomas y lisosomas, entre otros (Kawasaki & Kawai 2014). Entre todos los TLRs que se encuentran en las CC, el más estudiado es el receptor TLR4, que se activa en respuesta al lipopolisacárido bacteriano (LPS).

1.4 Activación y vía de señalización del receptor TLR4

1.4.1 Lipopolisacárido bacteriano

El LPS es un constituyente anfipático de la membrana externa de las bacterias Gram negativas reconocido, en términos inmunológicos, como MAMP. Debido a su toxicidad en animales y humanos, también es conocido como endotoxina (Kelly et al. 1991). Una molécula de LPS está constituida por tres regiones unidas covalentemente: el lípido A, el núcleo de oligosacáridos y el polisacárido O (**Figura 2**). La estructura y composición del polisacárido O es altamente variable entre las bacterias Gram negativas, por lo que es el determinante de cada cepa bacteriana. El núcleo del oligosacárido es menos variable y es común en un grupo grande de bacterias y, finalmente, el lípido A es la parte menos variable de la molécula y presenta una estructura y composición muy similar entre muchos tipos de bacterias Gram negativas. Todas las partes del LPS son inmunogénicas; sin embargo, la única estructura que ha sido involucrada en el choque endotóxico es el lípido A, que es reconocido por el receptor TLR4 e induce la producción del TNF α , que es el principal mediador involucrado en las acciones letales de la endotoxina. Los distintos quimiotipos de LPS aislados de bacterias, y administrados a animales de experimentación o a cultivos celulares, permiten el estudio de una gran cantidad de respuestas inmunes que también se manifiestan durante el choque séptico inducido por infecciones con bacterias Gram negativas (Galanos & Freudenberg 1993; Park & Lee 2013).

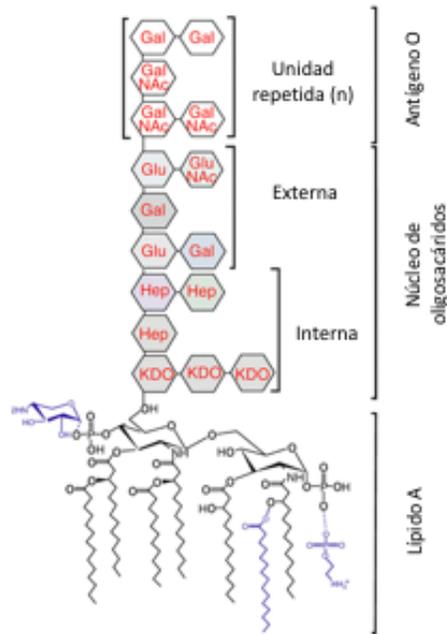


Figura 2. Estructura del LPS. Se muestra el nombre y características generales de todas los componentes de la molécula de LPS (Modificado de Arenas 2014).

1.4.2 El receptor TLR4 y su activación por LPS

El receptor TLR4 es una proteína integral de membrana, formada por un dominio extracelular que contiene motivos ricos en leucina, un dominio transmembranal y una región intracelular que presenta gran homología con el receptor para IL-1, que es conocida como dominio TIR (**Figura 3**). El primer paso para la activación del TLR4 es la unión de la endotoxina a la proteína de unión al LPS (LBP, por sus siglas en inglés), la cual reconoce al LPS liberado de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y se lo presenta al co-receptor CD14, que es una proteína que ayuda al acople de la endotoxina a un complejo formado por el TLR4 y la proteína de diferenciación mielóide (MD-2). Posteriormente, se forma un multímero conformado por dos complejos TLR4-MD2-LPS, el cual inicia el reclutamiento de varios adaptadores para la transducción de la señal a través de cinasas de serina-treonina (Sandig & Bulfone-Paus 2012; Avila & Gonzalez-Espinosa 2011).

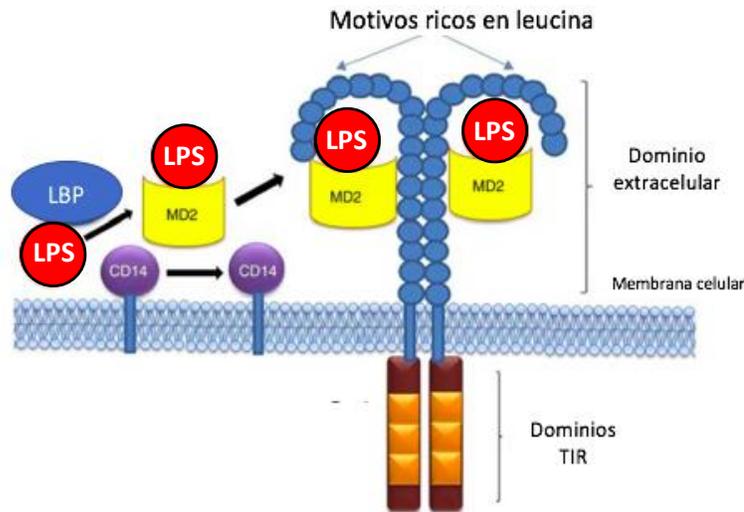


Figura 3. Esquema de la estructura del receptor TLR4. El LPS es reconocido por la LBP y después es presentado a CD14, al MD2 y, finalmente al propio TLR4 (Modificado de Mukherjee et al. 2016).

1.4.3 Vía de señalización del receptor TLR4

La señalización del receptor TLR4 ocurre a través de dos vías principales que han sido descritas en macrófagos y células dendríticas: la dependiente de MyD88 y la dependiente de TRIF (**Figura 4**). La vía dependiente de MyD88 ocurre desde la membrana plasmática e induce la producción de citocinas pro-inflamatorias por activación de distintos factores de transcripción como AP-1, IRF5 y NF κ B. Por otro lado, la vía dependiente de TRIF requiere de la internalización del receptor y activa al factor de transcripción IRF-3, induciendo la producción de interferón- β (IFN β) y una activación retardada de NF κ B, que contribuye a la producción de mediadores inflamatorios (Sandig & Bulfone-Paus 2012). En algunos modelos de CC, como en las derivadas de médula ósea (BMMCs), parece que la transducción de señales del TLR4 ocurre únicamente a través de la vía dependiente de MyD88; sin embargo, estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la activación del TLR4 por LPS puede inducir la internalización del receptor y la expresión de RNAm de IFN β a tiempos largos (Keck et al. 2011; Román-Figueroa, Tesis de Maestría, 2017), lo que sugiere la existencia de la vía independiente de MyD88, al menos en algunas condiciones.

Vía dependiente de MyD88

Después de la formación de los dos complejos TLR4-MD2-LPS en la membrana de la célula, la proteína MyD88 se une con Mal para formar un agregado adaptador con miembros de la familia de las cinasas IRAK, el cual es conocido como myddosoma. Durante la formación del myddosoma, la cinasa IRAK4 activa a IRAK1, la cual se autofosforila en diversos sitios y es liberada del complejo. Una vez liberada, IRAK1 se asocia con la ligasa de ubiquitina TRAF6. Posteriormente, TRAF6 se auto-ubiquitina y también poli-ubiquitina a la cinasa TAK1, lo que ocasiona la fosforilación de esta última y su activación. La activación de TAK1 promueve la señalización a través dos vías distintas: la vía de IKK-NF κ B y la vía de las MAP cinasas (MAPKs).

Para la activación de NF κ B, TAK1 se une al complejo IKK a través de las cadenas de ubiquitina, esto permite que IKK β , una de las subunidades catalíticas de IKK, se fosforile y se active. El complejo IKK activo puede fosforilar a la proteína inhibidora del NF κ B, I κ B, la cual sufre degradación proteasomal permitiendo al factor de transcripción translocarse al núcleo para iniciar la transcripción de genes pro-inflamatorios. La fosforilación de TAK1 también da por resultado la activación de la familia de las MAPK, tales como ERK1/2, p38 y JNK, las cuales regulan al factor de transcripción AP1 o la estabilización del RNAm para controlar las respuestas inflamatorias (Kawasaki & Kawai 2014; Avila & Gonzalez-Espinosa 2011) **(Figura 4)**.

Vía dependiente de TRIF

Después de la internalización del receptor, el adaptador molecular relacionado con TRIF (conocido como TRAM, por sus siglas en inglés) se une a los dominios intracelulares TIR del receptor TLR4 lo cual le permite la interacción con la proteína TRIF. Posteriormente, TRIF se fosforila e interactúa con TRAF6 y TRAF3. TRAF6 recluta a la cinasa RIP-1 que activa al complejo TAK1, permitiendo la activación de NF κ B y la vía de las MAPKs así como la producción de citocinas inflamatorias. Por otro lado, TRAF3 recluta a las cinasas TBK1 e IKKi para inducir la fosforilación de IRF3. Posteriormente, IRF3 forma un dímero y se transloca al interior del núcleo, en donde induce la expresión de genes para IFN de tipo 1 (Akira & Takeda 2004) **(Figura 4)**.

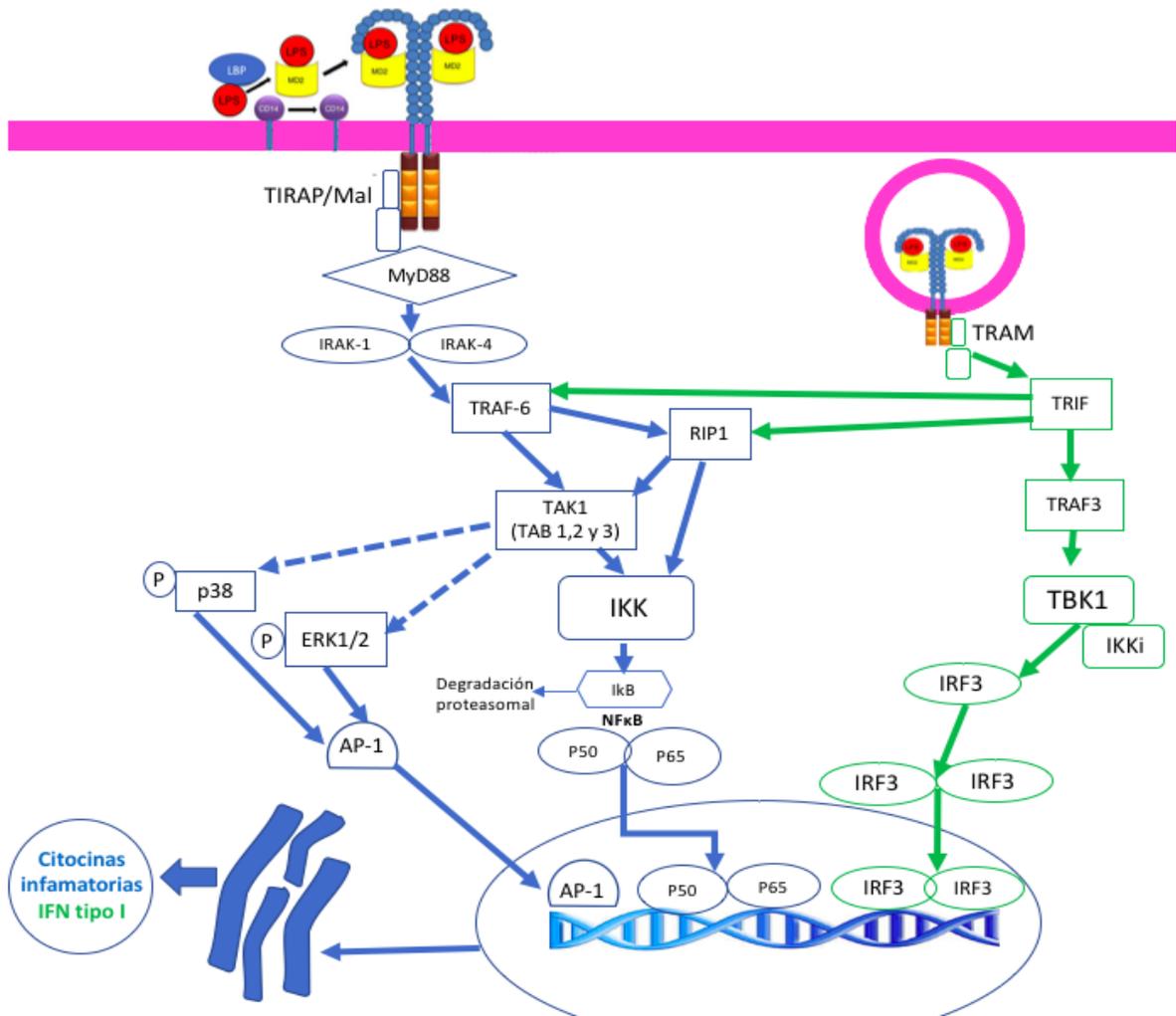


Figura 4. Vías de señalización del receptor TLR4. En azul se muestra la vía dependiente de MyD88 que ocurre desde la membrana plasmática. En verde se muestra la vía dependiente de TRIF la cual ocurre desde el interior de la célula una vez que el receptor se endocita. (Basado en el esquema de Gribar et al. 2008).

1.5 Modelos *in vivo* para el estudio de la respuesta al LPS

El LPS, o endotoxina, participa en la patofisiología de la inflamación, sepsis y choque endotóxico causado por bacterias Gram negativas *in vivo*. El LPS se libera al torrente sanguíneo durante la división celular o muerte bacteriana. La presencia de endotoxinas en la sangre se ha definido como endotoxemia. Una vez que el LPS es liberado a la sangre, se produce una cantidad grande de citocinas como el $TNF\alpha$, las interleucinas 6 y 8 (IL-6, IL-8) y factores pro-coagulantes. La liberación masiva de estos mediadores inflamatorios resulta deletérea para el huésped y puede generar daño endotelial,

hipoperfusión y daño de tejidos, coagulación intravascular diseminada y falla de múltiples órganos, todos ellos síntomas del choque séptico o choque endotóxico que tiene un índice de mortalidad alto (Sun & Shang 2015; Opal 2010).

En respuesta a la liberación de mediadores pro-inflamatorios durante la endotoxemia, las células del huésped producen distintos mediadores anti-inflamatorios como IL-4, IL-10, IL-13, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), glucocorticoides y prostaglandina E₂ (PGE₂). La interacción entre mediadores pro- y anti-inflamatorios juega un papel crucial en el control de la actividad inmune en contra de infecciones. Si el balance se pierde, el huésped puede sufrir una respuesta pro-inflamatoria masiva o una inmunosupresión que lo hace más susceptible a otras infecciones. Por esta razón, comprender los mecanismos de modulación entre los mediadores pro- y anti-inflamatorios puede derivar en el desarrollo de herramientas terapéuticas que tengan como finalidad restaurar la homeostasis del sistema inmune durante la sepsis (Karima et al. 1999).

Para poder validar los estudios que se realizan *in vitro* acerca de la respuesta al LPS y estudiar los mecanismos de control de los procesos inflamatorios durante la endotoxemia, se han utilizado diversos modelos *in vivo*, sobre todo en roedores, en particular, modelos de sepsis abdominal. Existen 4 clases de modelos intra-abdominales de sepsis que incluyen la administración intra-abdominal de productos bacterianos o pellets fecales, la inoculación de bacterias y la creación de una fuente endógena de materia fecal. Dentro de estos modelos, uno de los más empleados es la administración de LPS, debido a que es más fácil de utilizar y sus efectos son reproducibles (Deitch 2005).

1.5.1 Modelo de endotoxemia por administración de LPS y CC

El modelo de administración de la endotoxina se basa en la noción de que es la respuesta del huésped a las bacterias, y no el patógeno como tal, lo que induce la falla de órganos y mortalidad en la endotoxemia (Deitch 2005). Este modelo permite, además, conocer la

respuesta de las CC *in vivo* mediante la medición de la secreción de TNF α en la cavidad peritoneal de los ratones a los cuales se les administra LPS. Se ha descrito que después de una hora de la administración de endotoxina en la cavidad peritoneal, el TNF α que es secretado proviene únicamente de las CC, sin la participación de otros tipos celulares (Supajatura et al. 2002; Martín-Ávila et al. 2016).

1.6 Desarrollo de tolerancia al LPS

La detección de la endotoxina y la inducción de la vía de señalización del receptor TLR4 en células del sistema inmune genera una respuesta inflamatoria esencial para la eliminación del agente patógeno. Este proceso debe ser finamente regulado ya que una respuesta inflamatoria no controlada o excesiva induce daño a los tejidos y la manifestación de condiciones patológicas como sepsis, enfermedades autoinmunes y cáncer. Los organismos, tejidos y células han desarrollado mecanismos de adaptación para regular la inflamación excesiva con la finalidad de proteger al huésped de condiciones que pongan en peligro su vida o la integridad de los tejidos. Un ejemplo de estos mecanismos de protección es la tolerancia a la endotoxina (TE). La TE es un fenómeno en el cual las células (*in vitro*) o los organismos (*in vivo*) expuestos a concentraciones bajas del LPS durante tiempos prolongados, entran a un estado transitorio de hiporrespuesta y no son capaces de responder a retos posteriores con la endotoxina (Biswas & Lopez-Collazo 2009; Fan & Cook 2004). La TE también ha sido llamada desensibilización, inmunoparálisis o reprogramación; sin embargo, este fenómeno no consiste en una disminución global de vías de señalización o de producción de mediadores inflamatorios, ya que los animales o células tolerantes pueden, después de un tiempo, responder a retos posteriores de la endotoxina, por lo que los términos adaptación o reprogramación podrían resultar más cercanos a la definición de tolerancia. En modelos de tolerancia *in vitro*, el sistema experimental que se utiliza consiste en someter a las células a una exposición inicial al LPS, que se conoce como pre-exposición o pre-estimulación, y posteriormente a una segunda exposición con la misma endotoxina, que se conoce como activación, estimulación o segundo reto. Estos términos son

aplicables a todos los sistemas experimentales que se caracterizan por hacer dos exposiciones a la endotoxina, separadas por el tiempo.

Una de las respuestas más estudiadas durante el desarrollo de la TE es la inhibición en la secreción del TNF α en respuesta a un segundo reto con LPS, por lo que la disminución en la producción de este mediador inflamatorio es considerada una característica universal de la tolerancia al LPS (West & Heagy 2002).

1.6.1 Mecanismos moleculares que inducen el desarrollo de tolerancia

Durante el desarrollo de la TE, se han encontrado defectos en la señalización del TLR4 a nivel de la expresión y función de los adaptadores, moléculas de señalización y factores de transcripción.

Aunque existen estudios que reportan que la TE induce una disminución de la expresión del receptor TLR4 en la superficie celular (Sato et al. 2000), estudios más recientes han demostrado que el desarrollo de tolerancia no está relacionado con cambios en la expresión de este receptor en la membrana citoplasmática (Medvedev et al. 2001; Sly et al. 2004). Después de la activación del receptor TLR4, una de las primeras moléculas que se reclutan es IRAK4, a través de la proteína adaptadora MyD88. En células tolerantes se ha observado que la asociación de estas dos proteínas disminuye ante un segundo estímulo con LPS. De igual manera, la TE reduce la actividad cinasa de las proteínas IRAK4 y aumenta la expresión de IRAK-M (**Figura 5**). Esta última es una cinasa inactiva que previene la disociación de IRAK1 e IRAK4 del complejo MyD88 y, por lo tanto, inhibe la formación del complejo IRAK-TRAF6 actuando como un regulador negativo de la vía de señalización del TLR4 (Fan & Cook 2004).

La disminución en la actividad cinasa de varias moléculas que forman parte de la vía de señalización del TLR4 es otro evento importante que se presenta durante la TE. En células tolerantes se ha observado una disminución de la actividad de la proteína cinasa C, de la fosforilación de MAPKs, y se sabe que un pretratamiento con LPS inhibe la

degradación de I κ B, lo cual bloquea la activación del factor de transcripción NF κ B, favoreciendo el desarrollo de TE.

SOCS-1 es otra proteína que se induce rápidamente por la estimulación con LPS y regula negativamente la vía de señalización del TLR4 ya que inhibe la actividad de NF κ B al asociarse directamente con IRAK (Fan & Cook 2004).

Las células tolerantes a la endotoxina presentan cambios a nivel de los factores de transcripción. Como se describió anteriormente, la estimulación con LPS induce la activación de los factores de transcripción NF κ B y AP-1, que promueven la producción de mediadores pro-inflamatorios. La familia NF κ B está compuesta de varios miembros que incluyen p50, p52, p65, RelB y c-Rel, los cuales pueden formar homodímeros y heterodímeros. En un estado no tolerante, el LPS induce predominantemente la formación del heterodímero p50/p65; sin embargo, durante el estado de tolerancia la formación de este complejo disminuye y se favorece la del complejo p50/p50. El incremento en la expresión del homodímero p50/p50 favorece su unión a las regiones promotoras, bloqueando la actividad de p65 (Fan & Cook 2004).

En cuanto al factor de transcripción AP-1, activado por la vía de la MAPKs, se sabe que en macrófagos pre-tratados con LPS, la unión de AP-1 al DNA está disminuida (Medvedev et al. 2000).

1.6.2 Mecanismos que regulan la TE de forma indirecta

A diferencia de los mecanismos moleculares para el desarrollo de TE descritos anteriormente, que ocurren en respuesta a la estimulación directa del receptor TLR4, existen otros eventos que inducen el mismo fenómeno de forma indirecta. Por ejemplo, los mediadores inducidos por el LPS pueden contribuir al desarrollo y establecimiento de la TE actuando de forma autocrina. Aunque los mecanismos indirectos para la inducción de tolerancia al LPS no han sido descritos completamente, se sabe que la IL-10 y el TGF- β participan de forma importante en este fenómeno (**Figura 5**).

La IL-10 es una citocina que inhibe la expresión de diversos genes que promueven la producción de mediadores pro-inflamatorios. En distintos modelos celulares se ha demostrado que el tratamiento con LPS aumenta la síntesis de IL-10, la cual actúa de forma autocrina, activando a su receptor. Esta acción autocrina lleva a la activación de STAT3, que se requiere para la transcripción de SOCS3 y BCL3, que regulan negativamente la activación de diversos factores de transcripción, como NF κ B (Biswas & Lopez-Collazo 2009).

Con respecto al TGF- β , se sabe que es un factor anti-inflamatorio e inmunomodulador que también se produce en respuesta a la estimulación con LPS, y que actúa de forma autocrina induciendo un incremento en la expresión de la fosfatasa SHIP. SHIP degrada al fosfatidil-inositol-trifosfato (PIP₃) y bloquea la vía de PI3K/AKT. Se ha demostrado que su inducción es indispensable para el desarrollo de TE, ya que actúa como un inhibidor endógeno potente de la vía de NF κ B (Sly et al. 2004).

Además de los mecanismos de inducción de tolerancia que se han descrito anteriormente, se ha estudiado la participación de otras moléculas que contribuyen al desarrollo de este fenómeno, cuya consecuencia principal es la inhibición de la activación del factor de transcripción NF κ B. Los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de TE se ilustran en la **Figura 5**.

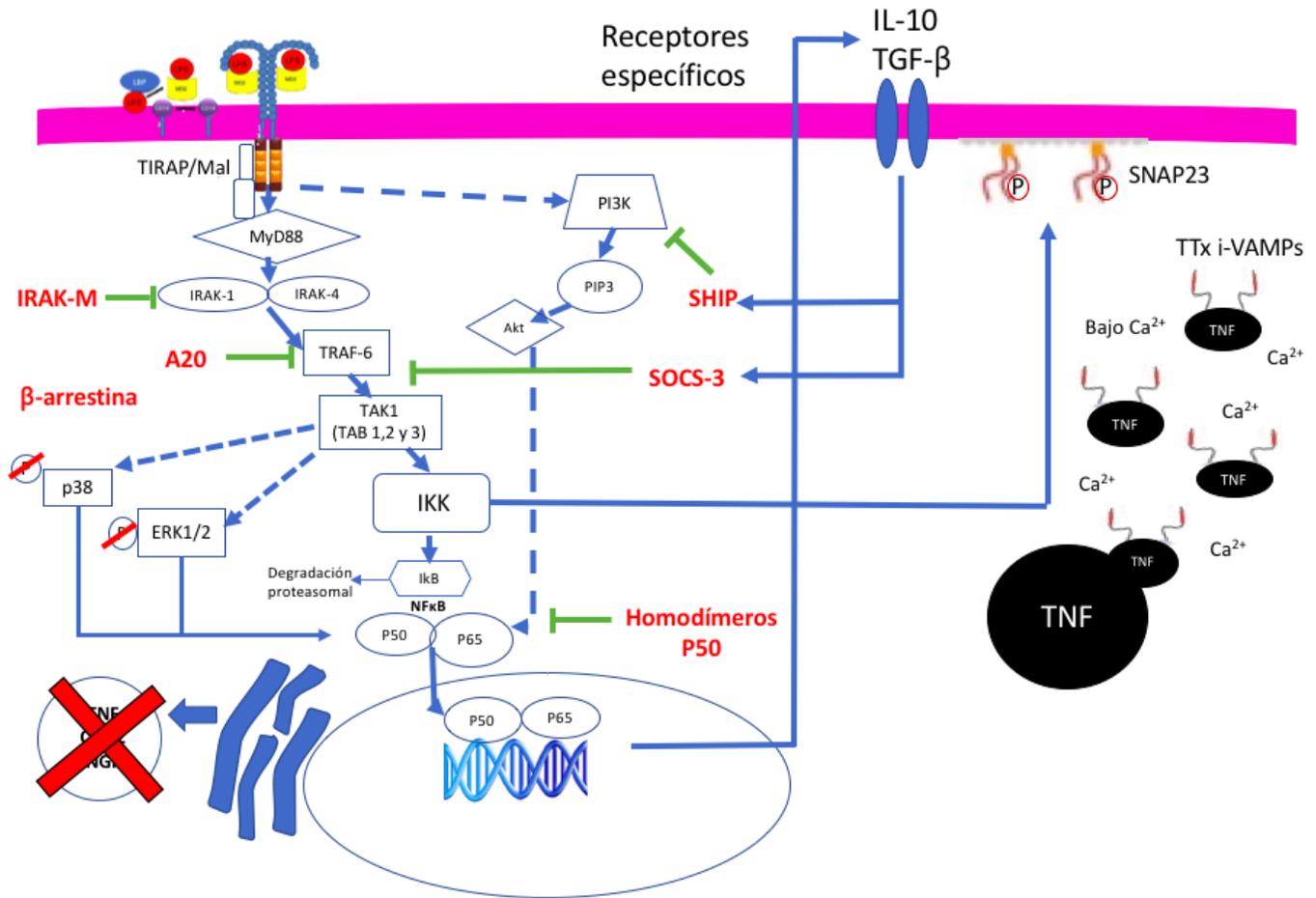


Figura 5. Mecanismos moleculares involucrados en el establecimiento de la tolerancia a la endotoxina. Distintos reguladores negativos de la vía de señalización del TLR4 con relevancia en el desarrollo de TE se ilustran en color rojo. Muchas de estas proteínas han sido descritas principalmente en monocitos/macrófagos (Biswas & Lopez-Collazo 2009). En círculos negros se ilustra el TNF preformado para mostrar otro posible punto de regulación de secreción de este mediador inflamatorio durante la tolerancia en CC.

Se sabe poco acerca de la acción autocrina de otras moléculas liberadas en respuesta a la estimulación con LPS, que contribuyan al establecimiento y desarrollo del fenómeno de tolerancia de forma heteróloga. Algunos candidatos que pueden funcionar modulando la acción de la activación del TLR4 son algunas moléculas de origen lipídico. Se ha descrito que las amidas lipídicas del tipo de las N-aciletanolaminas (NAES), grupo al que pertenecen los endocannabinoides, son capaces de modular la activación de las CC por un mecanismo de retroalimentación negativa que ocurre en respuesta a señales de activación (Aloe et al. 1993; Hesselink 2013). Por esta razón y por la relevancia para el presente trabajo, a continuación, se revisa el sistema endocannabinoide.

1.7 El sistema endocannabinoide

El sistema cannabinoide está constituido por tres componentes principales: los receptores clásicos a cannabinoides CB₁ y CB₂, los ligandos endógenos de esos receptores denominados endocannabinoides (eCN) y las enzimas involucradas en su síntesis e inactivación (Lu & Mackie 2016).

1.7.1 Endocannabinoides (eCN)

Los eCN son moléculas endógenas, de origen lipídico, que se derivan del ácido araquidónico. Estas moléculas no están almacenadas sino que se sintetizan a demanda, a partir de precursores presentes en la membrana plasmática de las células, por la acción de enzimas que se activan en respuesta al incremento de calcio intracelular (Zou & Kumar 2018; Pandey et al. 2009). Aunque existen distintos eCN (**Figura 6**), los más estudiados son la araquidonoil etanolamina o anandamida (AEA) y el 2-araquidonoil glicerol (2-AG). Los niveles basales de 2-AG son mayores que los de la AEA en diversos tejidos (Lu & Mackie 2016; Wood et al. 2008; Ueda & Tsuboi 2012; Hillard 2017) y se ha reportado que el 2-AG presenta mayor eficacia que la AEA para activar a los receptores a cannabinoides.

Las principales funciones de los eCN incluyen la neuromodulación, el control de funciones motoras, de la cognición, de respuestas emocionales, de la motivación y de la homeostasis. En la periferia, los eCN son moduladores importantes del sistema nervioso autónomo, del sistema inmunológico y de la microcirculación (Pandey et al. 2009).

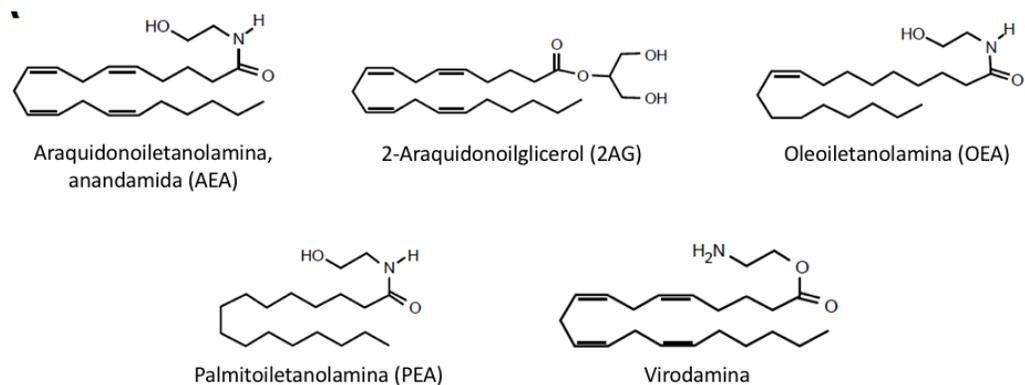


Figura 6. Estructura de algunos cannabinoides endógenos
(Modificado de Bakali & Tincello 2013).

1.7.2 Receptores a eCN

La familia de receptores clásicos a eCN está constituida por dos receptores: el receptor tipo 1 (CB₁) y el receptor tipo 2 (CB₂). Estos dos receptores de 7 dominios transmembranales, acoplados a proteínas G (GPCRs), están primordialmente asociados a proteínas de las clases G_i y G_o. En general, su activación inhibe la acción de la adenilato ciclasa (AC) y algunos canales dependientes de calcio (del tipo N-, P- y Q) e induce la fosforilación de diversas MAPKs y la activación de canales rectificantes de potasio (Lu & Mackie 2016).

El receptor CB₁ posee 475 aminoácidos (a.a.) en humanos y 473 a.a. en ratones y está expresado abundantemente en el sistema nervioso central (SNC), particularmente en la corteza, en los ganglios basales, en el hipocampo y en el cerebelo, aunque también existe evidencia de la expresión de estos receptores en el músculo esquelético, hígado, islotes pancreáticos y en diversas células del sistema inmune. A nivel del SNC, la mayoría de los receptores CB₁ se encuentran presentes en las terminales axónicas de las neuronas y en los segmentos axónicos pre-terminales (Zou & Kumar 2018; Lu & Mackie 2016; Pandey et al. 2009).

Por otro lado, el receptor CB₂ tiene 360 a.a. en humanos y 347 a. a. en ratones y comparte el 44% de similitud con el CB₁ (Pandey et al. 2009). Aunque el CB₂ se

encuentra también en el SNC, sus niveles de expresión son menores con respecto al CB₁; sin embargo, se expresa abundantemente en el sistema inmune, en donde actúa como inmunomodulador y blanco para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y estados alérgicos (Reggio 2010). También se ha encontrado en otros tejidos periféricos, como el sistema cardiovascular, el tracto gastrointestinal, el hígado, el tejido adiposo, los huesos, y el aparato reproductivo (Zou & Kumar 2018).

Además de los dos receptores a cannabinoides mencionados anteriormente, existen otros GPCRs que pueden ser activados por los eCN o moléculas relacionadas. Estos incluyen el GPR55, GPR18 y el GPR119. Además, los eCN tienen la capacidad de activar otros tipos de receptores como los canales TRP, los receptores de glicina (Ibsen et al. 2017), y los receptores PPAR (Maccarrone et al. 2016).

1.7.3 Síntesis y degradación de eCN

A pesar de que tanto la AEA y el 2-AG son derivados del ácido araquidónico, sus rutas de biosíntesis y degradación son distintas y están reguladas por enzimas diferentes. Debido a que el 2-AG es el más abundante en el organismo y a que es un agonista total del receptor CB₂, del cual se han descrito funciones importantes en las células del sistema inmune, en este estudio nos enfocamos en estudiar este eCN cuya síntesis y degradación se describe a continuación.

La mayor parte del 2-AG parece ser sintetizado en respuesta a la hidrólisis secuencial de una molécula de araquidonoil unida a fosfatidilinositol di-fosfato (PIP₂) por acción de la fosfolipasa C (PLC)- β , seguida de la hidrólisis de la molécula resultante, el diacilglicerol (DAG), por la diacilglicerol lipasa (DAGL) (**Figura 7A**). Existe una segunda ruta de síntesis del 2-AG; ésta depende del corte del fosfatidilinositol por acción de la fosfolipasa A (PLA), seguida de la hidrólisis del grupo éster por una liso-PLC; sin embargo la importancia de esta vía no ha sido definida (Lu & Mackie 2016).

Por otro lado, la degradación del 2-AG (**Figura 7B**) ocurre principalmente por la acción de 3 enzimas hidrolíticas distintas, la monoacilglicerol lipasa (MAGL) y las α/β hidrolasas (ABDH) 6 y 12. De igual manera, el 2-AG puede ser oxidado por la ciclooxygenasa-2 (COX-2) e hidrolizado, bajo ciertas condiciones, por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Lu & Mackie 2016).

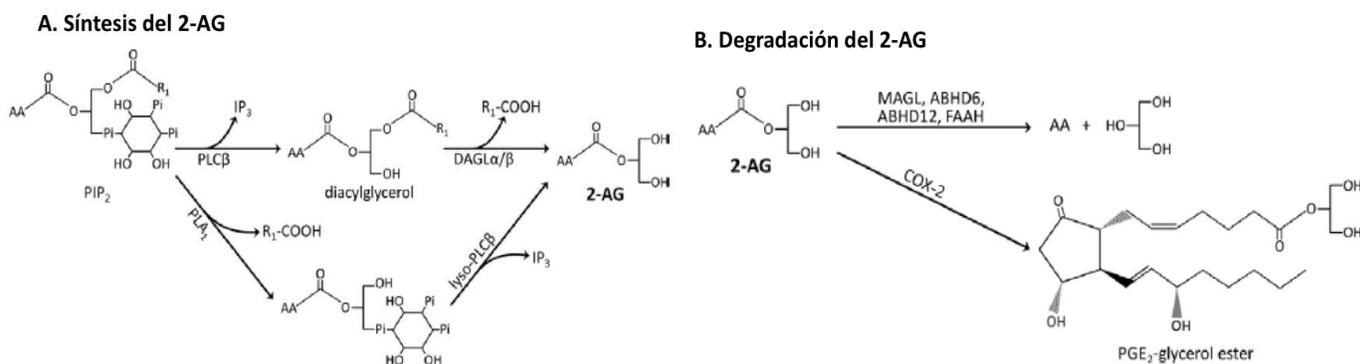


Figura 7. Vías de síntesis y degradación del 2-AG. La descripción detallada de las vías de síntesis y degradación se encuentra en el texto (Tomada de Lu & Mackie 2016).

1.8 Vías de señalización de los receptores a eCN

1.8.1 Vía dependiente de proteínas G

Tanto el receptor CB $_1$ como el receptor CB $_2$ son miembros de los GPCRs que están acoplados a la proteína G $_{i/o}$ (**Figura 8**). La activación de estos receptores permite la disociación de la proteína G $_i$ en la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$. Después, la G α_i unida a GTP se asocia con la AC, inhibiendo así la producción de cAMP, que tiene como consecuencia la inhibición de la proteína cinasa A (PKA) que requiere del cAMP para disociarse de sus unidades auto-inhedoras (Scotter et al. 2009). Se ha reportado además que el receptor CB $_1$, pero no el CB $_2$, puede activar a otro tipo de proteínas G dependiendo del tipo celular y del ligando (Demuth & Molleman 2006).

Los receptores a cannabinoides pueden modular distintos tipos de canales iónicos. En diferentes modelos celulares se ha reportado que la activación de los receptores a

cannabinoides inhibe los canales de calcio tipo N-, P/Q- y R-. Los receptores CB₁, pero no los CB₂, activan a los canales rectificadores de potasio (GIRKs) (Scotter et al. 2009). Además de la modulación de canales iónicos, la activación de los receptores CB₁ y CB₂ lleva a la señalización a través de la vía de las MAPKs, incluyendo a ERK1/2, JNK y p38, las cuales están involucradas en la proliferación celular, el control del ciclo celular y la muerte de las células. La activación de ERK1/2 puede estar regulada por las subunidades βγ de la proteína G_i, la β-arrestina, la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) o la activación de proteínas de la familia de Src, como Fyn. La activación de ERK por cualquiera de las vías mencionadas anteriormente, depende del microambiente y del tipo de estímulo (Zou & Kumar 2018; Scotter et al. 2009).

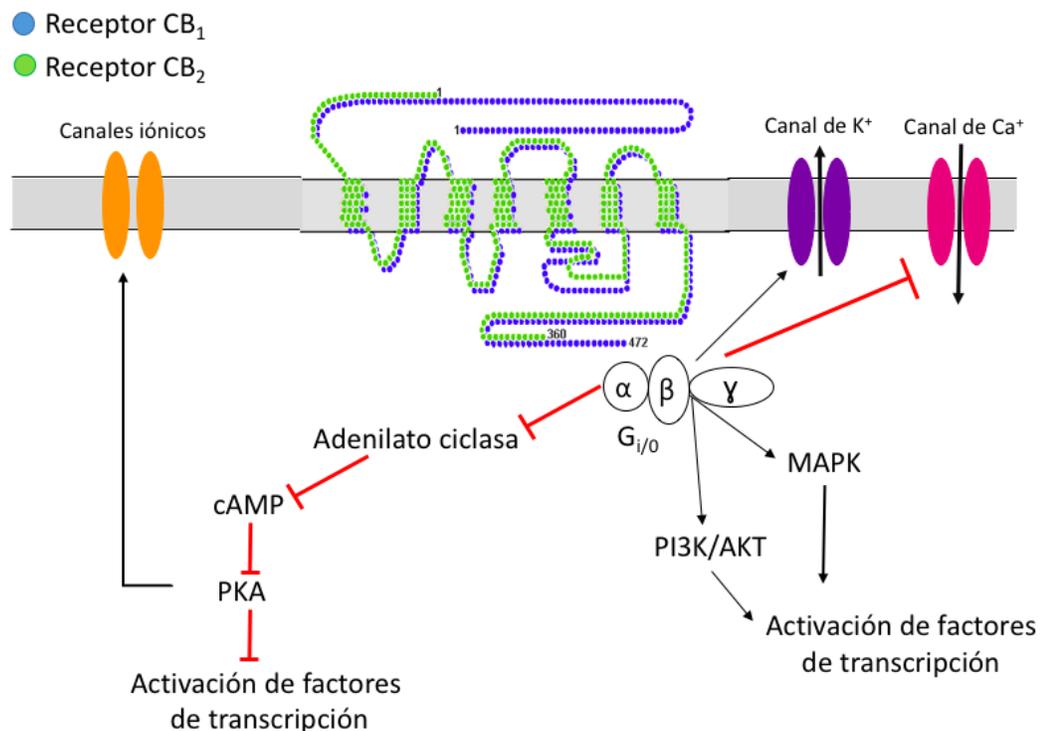


Figura 8. Vías de señalización dependientes de la activación de los receptores a cannabinoides. Se muestran las dos vías principales de señalización en respuesta a la activación de la proteína G_{i/o}. En color rojo se ilustra la inhibición de proteínas y en color negro la activación.

1.8.2 Vía independiente de proteínas G

Además de la vía clásica de señalización a través de las proteínas G, los receptores a cannabinoides pueden señalizar a través de otras moléculas citosólicas como la β-arrestina (β-arr). Después de la activación de los GPCRs por un ligando, los receptores

son fosforilados por la cinasa de los GPCRs (GRK); esta fosforilación induce la unión de la β -arr al receptor, lo cual da inicio al proceso de internalización durante el cual, esta molécula puede regular la señalización del receptor. Se ha encontrado que la β -arr puede activar a ERK1/2 y a Src desde compartimentos intracelulares (Scotter et al. 2009).

1.9 Funciones del sistema eCN a nivel central

Los eCN han sido estudiados más ampliamente en el SNC, en donde se han descrito tanto los mecanismos para su síntesis como las distintas funciones que llevan a cabo. La producción de los eCN en el SNC tiene las siguientes características: i) se sintetizan a demanda, en una neurona postsináptica en respuesta a la despolarización intensa; ii) su síntesis requiere el aumento intracelular de las concentraciones de Ca^{2+} y/o de la activación constante de receptores acoplados a proteínas G_q , sin que se modifique la concentración de Ca^{2+} intracelular; y iii) requiere la activación de las enzimas que sintetizan a los eCN o sus precursores (Hashimoto et al. 2013). Una vez que los eCN son sintetizados, se liberan al espacio sináptico por difusión facilitada para ejercer sus efectos al unirse a sus receptores CB_1 , localizados en las terminales de las neuronas adyacentes, proceso al que se le denomina señalización retrógrada. Los efectos de los eCN más estudiados en el SNC son los que están relacionados con la inhibición de la liberación de neurotransmisores de las terminales presinápticas. Este efecto se caracteriza por dos eventos independientes, que se conocen como supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI) en terminales de neuronas GABAérgicas e inhibición de la excitación inducida por despolarización (DSE) en terminales de neuronas glutamatérgicas, que son dos formas de plasticidad sináptica de corto plazo (**Figura 9**) (Sugiura et al. 2006).

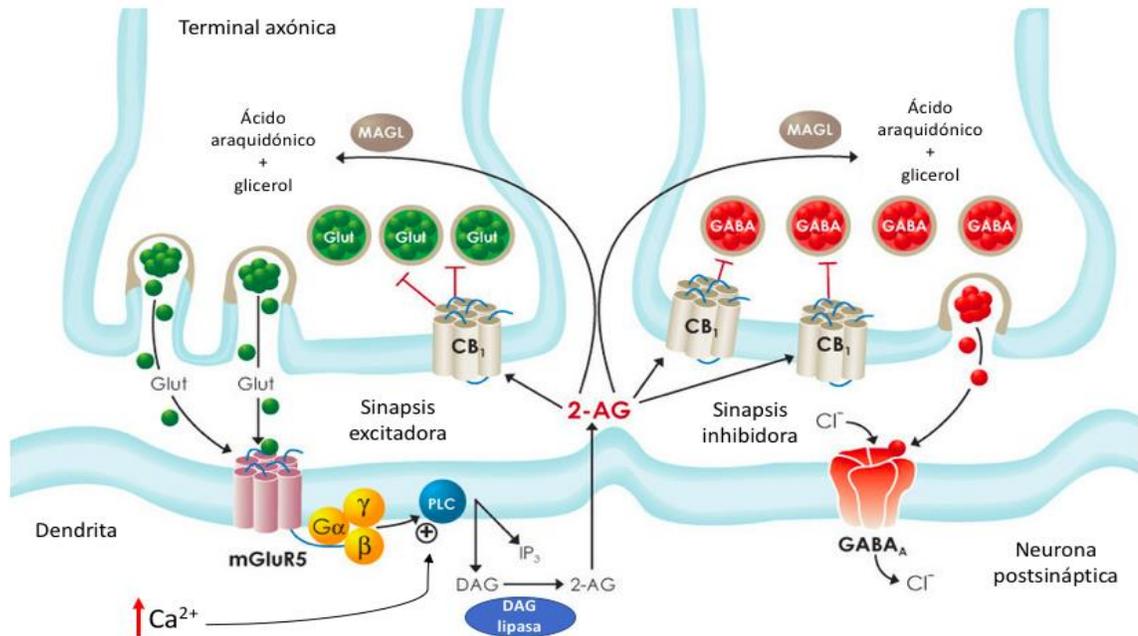


Figura 9. Señalización retrógrada de los eCN a nivel del SNC. La imagen ilustra los requerimientos para la síntesis del 2-AG en neuronas postsinápticas así como su mecanismo de acción para inhibir la secreción de neurotransmisores de las neuronas presinápticas (Modificado de Brock, 2008).

Debido a la gran cantidad de receptores CB_1 que se encuentran en distintas áreas del SNC y a que los eCN inhiben la secreción de neurotransmisores, tanto de circuitos neuronales excitadores como inhibidores, las consecuencias de las acciones de estas moléculas es la modulación de diversos eventos fisiológicos específicos (Zou & Kumar 2018; Lu & Mackie 2016).

1.10 Funciones del sistema eCN a nivel periférico

Un aspecto de la acción de los cannabinoides y eCN que requiere ser considerado, es que sus efectos son dependientes de la concentración. Estas moléculas pueden producir efectos opuestos a concentraciones nanomolares de los observados a concentraciones micromolares, por lo que se considera que sus acciones son bifásicas. Los efectos duales han sido demostrados a nivel periférico, en donde se sabe que los eCN participan en la regulación de distintos tejidos y sistemas. Por ejemplo, en el sistema cardiovascular pueden proteger durante enfermedades cardiovasculares disminuyendo la activación patológica en el endotelio vascular y ejerciendo efectos protectores en los cardiomiocitos,

pero también pueden disminuir la función de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA) llevando a disfunción o falla cardíaca cuando son producidos en grandes cantidades por cardiomiocitos dañados. En el tracto gastrointestinal, los eCN pueden estimular la motilidad y suprimir la secreción de ácidos bajo condiciones homeostáticas, sin embargo, en estados patofisiológicos, en donde se ha detectado un nivel mayor de eCN, la activación de los receptores CB_1 y CB_2 tiene el efecto opuesto al reducir la motilidad intestinal. En el hígado, la activación de los receptores a cannabinoides también tiene efectos duales al favorecer o inhibir el desarrollo de fibrosis. A nivel del músculo esquelético, los eCN pueden modular positiva o negativamente el metabolismo energético y la formación de fibras musculares nuevas. Esto depende de las condiciones del organismo, ya que, en personas obesas en donde hay una mayor producción de eCN, los efectos parecen ser negativos (Maccarrone et al. 2016).

Además de los sistemas mencionados anteriormente, los eCN también participan en: el sistema reproductivo, modulando eventos durante el embarazo como la implantación del blastocisto y el desarrollo normal del embrión; la piel, en donde regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular y; el sistema inmunológico, sobre el que tienen numerosos efectos que se mencionan en la siguiente sección, y han ganado importancia debido a su uso potencial como blanco para controlar procesos inflamatorios (Maccarrone et al. 2016; He et al. 2018).

1.10.1 Funciones de los eCN en el sistema inmune

Con respecto al sistema eCN y el sistema inmunológico, se sabe que las células inmunes expresan tanto al receptor CB_1 como al receptor CB_2 pero en algunos casos, los niveles de expresión de los receptores CB_2 son de 10 a 100 veces más que los receptores CB_1 (Parolaro et al. 2002; Galiègue et al. 1995). Estas células pueden producir eCN en respuesta a estímulos inflamatorios y poseen los sistemas funcionales de síntesis, recaptura y degradación para estas moléculas (Parolaro et al. 2002). Por ejemplo, distintos estudios *in vitro* han demostrado que la estimulación con LPS incrementa la

producción de AEA y 2-AG en algunas células del sistema inmune como los macrófagos, células mononucleares de sangre periférica y células dendríticas tanto de animales como de humanos (Klein 2005).

Se ha reportado que, la AEA, el 2-AG, y otros cannabinoides, modulan las respuestas inmunes actuando principalmente sobre el receptor CB₂. Específicamente, estos efectos inmunomoduladores se han estudiado en modelos de esclerosis múltiple, diabetes, choque séptico, artritis reumatoide, colitis, enfermedad de Alzheimer, entre otros (Rom & Persidsky 2013). Por otro lado, resultados de estudios en modelos animales han demostrado que los eCN ejercen sus efectos anti-inflamatorios por 4 mecanismos principales que han sido descritos en diversas células inmunes: 1) induciendo apoptosis (macrófagos y linfocitos T); 2) suprimiendo la proliferación celular (linfocitos T y B); 3) inhibiendo la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias y aumentando la síntesis de citocinas anti-inflamatorias (monocitos, macrófagos y CC); y 4) mediante la inducción de células T reguladoras (Rom & Persidsky 2013; He et al. 2018).

De forma general, el efecto de los cannabinoides y eCN sobre las funciones inmunes es principalmente anti-inflamatorio y parece ser transitorio, lo que permite que los efectos inhibidores que inducen en el sistema inmune puedan revertirse en caso de que éste requiera ser activado durante un proceso infeccioso (Pandey et al. 2009). Aunque las funciones de los eCN en las células inmunes siguen siendo motivo de investigación, se cree que la señalización de los eCN provee un control tónico de la activación del sistema inmunológico limitando la activación espontánea de las funciones de las células (Neish 2018; Pandey et al. 2009). Contrario a los efectos inhibidores sobre las respuestas inflamatorias descritos anteriormente, estudios recientes han demostrado que los cannabinoides pueden tener efectos pro-inflamatorios (Croxford & Yamamura 2005). Esta aparente contradicción puede deberse a la respuesta bifásica relacionada con las concentraciones de los ligandos de los receptores a cannabinoides, por lo que controlar la concentración utilizada para estudiar la respuesta inmunológica, resulta importante.

1.10.2 eCN y CC

De manera particular, se ha encontrado que los eCN tienen efectos importantes en las CC. Desde los años 90, el grupo de Rita Levi-Montalcini descubrió que los eCN, en particular la palmitoiletanolamida (PEA) que es un análogo de la AEA, actúa como modulador natural de la activación de las CC, contrarrestando las acciones inflamatorias que se presentan en condiciones patológicas (Aloe et al. 1993). De igual manera, estos investigadores propusieron que los eCN podían actuar como autacoides (moléculas que se producen y actúan localmente) y acuñaron el término ALIA (*autacoid local inflammation antagonism*). Así, una ALIAmida es un autacoide que se sintetiza en respuesta al daño o la inflamación y actúa localmente para contrarrestar dicho daño (Hesselink 2013; Aloe et al. 1993).

En estudios recientes, se ha mostrado que las CC expresan los receptores CB₁ y CB₂ y que varios eCN tienen efectos sobre ellas. El eCN más estudiado en CC es la PEA que inhibe la desgranulación inducida por el incremento de Ca²⁺ y la secreción de TNF α dependiente de LPS; sin embargo, aún existen discrepancias acerca de si estos efectos están mediados por la acción de este eCN sobre los receptores CB₁ o CB₂, ya que la afinidad de la PEA por los mismos no es muy alta (Pandey et al. 2009; Chiurchiù 2016). Actualmente se sabe que la AEA y el 2-AG también tienen efectos sobre las CC. Por ejemplo, la AEA limita la maduración y activación excesiva de las CC de forma dependiente del receptor CB₁ y puede reducir la secreción de TNF α , mientras que el 2-AG inhibe la secreción de histamina inducida por un estímulo antigénico y de forma dependiente del receptor CB₂. Con respecto al 2-AG, no existen estudios que indiquen si tiene algún efecto sobre la secreción de citocinas en CC. Finalmente, también se ha reportado que los agonistas para los receptores CB₁ y CB₂ previenen la angiogénesis dependiente de CC durante la formación de granuloma (Pandey et al. 2009).

1.11 Tráfico vesicular de los GPCRs

El estudio del tráfico intracelular de los GPCRs es relevante debido al conocimiento reciente de que la localización intracelular de estos receptores forma parte importante de su sistema de señalización (Nogueras-Ortiz & Yudowski 2016). Como se mencionó anteriormente, la unión de un ligando a los GPCRs inicia también una serie de procesos que contribuyen a la endocitosis del receptor e inducen su tráfico vesicular, lo cual puede modificar los mecanismos de señalización.

1.11.1 Endocitosis de GPCRs

En general, el mecanismo por el cual ocurre la endocitosis de los GPCRs se activa pocos minutos después de su estimulación por un ligando, e incluye la fosforilación de los receptores por cinasas de serina/treonina, específicas para los GPCRs, conocidas como GRKs. Esta fosforilación ocurre en la tercera asa intracelular y en el dominio carboxilo-terminal de los receptores, lo cual evita la unión a las proteínas G pero facilita la unión de las β -arr, las cuales, como se mencionó con anterioridad, forman parte de la vía de señalización de estos receptores. La vía de endocitosis más estudiada para los GPCRs es la dependiente de clatrina. En este mecanismo de internalización, las β -arr funcionan como proteínas adaptadoras endocíticas intermediarias, que marcan como blanco para endocitosis a los GPCRs, a través de su asociación con la proteína AP2 y la clatrina (**Figura 10**). Los GPCRs internalizados pueden seguir varias rutas ya que pueden ser desfosforilados en endosomas y reciclados a la membrana plasmática, retenidos en endosomas o llevados a lisosomas para su degradación (Seachrist & Ferguson 2003).

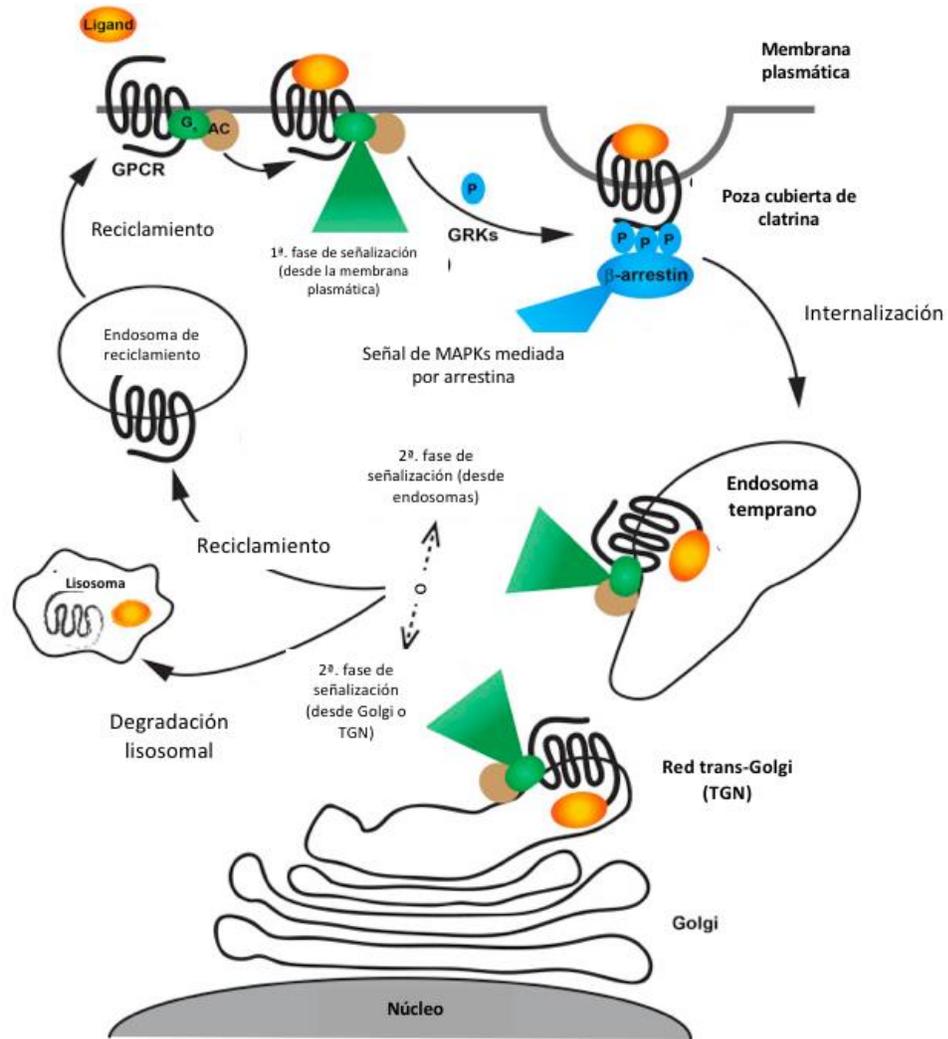


Figura 10. Endocitosis de los GPCRs. La estimulación de un GPCR por su ligando induce la primera fase de señalización desde la membrana plasmática que depende de las proteínas G. Después de algunos minutos de unión del ligando, el receptor es fosforilado por las GRKs lo cual permite la unión de la β -arr y da inicio al proceso de internalización del GPCR. El receptor internalizado puede localizarse en endosomas tempranos, en la red trans-Golgi (TGN) desde donde puede seguir señalizando, o puede seguir la vía de reciclamiento para volver a la membrana plasmática o dirigirse a lisosomas para su degradación (Modificado de Calebiro & Godbole 2018).

1.11.2 Proteínas que participan en el tráfico vesicular de los GPCRs

β -arrestina

La capacidad de los GPCRs para formar un complejo estable con la β -arr después de su internalización regula el destino de estos receptores. Existen 4 isoformas de arrestinas: la arrestina-1 y la arrestina-4, que son también conocidas como arrestina de bastones y arrestina de conos, respectivamente, y se encuentran principalmente en el ojo, y las arrestinas-2 y -3, más comúnmente llamadas, β -arrestina1 (β -arr1) y β -arrestina2 (β -

arr2), que se distribuyen de forma ubicua (Hilger et al. 2018). Con respecto a la unión de los GPCRs con las arrestinas, se han definido dos clases funcionales de receptores: los de la clase A se unen preferentemente a la β -arr2, no se internalizan unidos a ella y son reciclados a la membrana plasmática de forma eficiente. Por otro lado, los receptores de la clase B, se unen tanto a la β -arr1 y a la β -arr2 con igual eficacia, se internalizan manteniendo su unión con estas proteínas y no son reciclados de vuelta a la membrana plasmática de forma eficiente (Seachrist & Ferguson 2003). Existen algunas excepciones, por ejemplo, los receptores a opioides que se consideran de la clase A, dependiendo del ligando que se utilice para su estimulación, pueden internalizarse y mantenerse en el citoplasma unidos a la β -arr2 (Williams et al., 2013; Martínez-Cuevas, Tesis de Maestría). Algunos de los elementos determinantes que distinguen a las dos clases de receptores son los sitios de fosforilación para las proteínas GRK, sobre todo en la región C-terminal de los receptores. Se ha propuesto que los distintos patrones de fosforilación de los GPCRs permiten que tanto los receptores como las arrestinas adopten distintas conformaciones que modifican la afinidad de unión entre estas dos proteínas y regulan las vías de señalización que activan (Lohse & Hoffmann 2014; Hilger et al. 2018).

El papel de las β -arr en el ciclo de internalización-reciclamiento de los GPCRs no es sencillo de estudiar debido a que estas proteínas sufren diversas modificaciones durante este proceso. Tanto la β -arr1 como la β -arr2 se fosforilan, se ubiquitinan, se nitrosilan y se unen a otros adaptadores que pueden modificar su interacción con los receptores (Lohse & Hoffmann 2014).

GTPasas Rab

Las GTPasas Rab son proteínas G pequeñas, del tipo de Ras, que se asocian fuertemente a membranas y controlan una gran variedad de procesos celulares como la endocitosis, el tráfico vesicular, la fusión de endosomas y la exocitosis. Estas proteínas oscilan entre un estado activo, unido al trifosfato de guanina (GTP), y un estado inactivo, unido a difosfato de guanina (GDP). La unión a uno u otro nucleótido está regulada por la actividad de GTPasas, que aceleran la velocidad de hidrólisis del GTP a GDP lo cual

regula negativamente la señal, y por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), los cuales catalizan el intercambio de GDP a GTP (**Figura 11**).

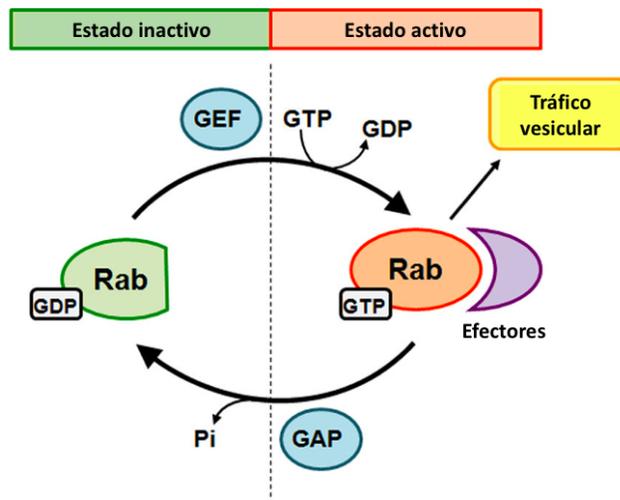


Figura 11. Esquema del ciclo de las GTPasas Rab. Las GTPasas Rab pueden estar unidas a GDP (representado en verde) o a GTP (en color naranja) las cuales representan el estado inactivo y activo, respectivamente. El cambio de unión de GDP por GTP está catalizado por GEF, mientras que la conversión de GTP por GDP depende de la acción de GAP. Las proteínas Rab en estado activo regulan el tráfico vesicular de diferentes proteínas (Modificado de Wang et al. 2017).

Una de las propiedades más importante de las GTPasas Rab es que existen isoformas individuales de estas proteínas, que están localizadas en las superficies de las membranas de distintos organelos y, en algunos casos, en microdominios diferentes de los mismos, a la vez que están localizadas en compartimentos específicos tanto de la vía endocítica como de la vía exocítica. Esto permite que la detección de las proteínas Rab se utilice como herramienta importante para identificar la localización de otras moléculas (como algunos receptores) dentro de la célula y, por lo tanto, su tráfico vesicular. Por ejemplo, Rab4 y Rab5 están localizadas en los endosomas tempranos, Rab11 se encuentra en endosomas de reciclamiento en la zona perinuclear y Rab7 y Rab9 están en endosomas tardíos y lisosomas (Seachrist & Ferguson 2003).

Se ha identificado la participación de Rab4, Rab5, Rab7 y Rab11 en la regulación de la endocitosis y el tráfico vesicular de GPCRs. Las actividades de estas Rabs se mencionan a continuación:

Rab5

Esta proteína se encuentra localizada en la membrana plasmática, en las vesículas cubiertas de clatrina y en los endosomas tempranos. Rab5 participa en la biogénesis endosomal y en la fusión con otras membranas que determinan el destino de los receptores internalizados. Para que Rab5 pueda inducir la fusión de los endosomas tempranos con otras vesículas, requiere de la participación de una proteína efectora denominada autoantígeno de endosomas tempranos (EEA-1). De igual manera, Rab5 regula la movilidad de los endosomas mediante el reclutamiento y activación de los microtúbulos (Woodman 2000).

Rab4 y Rab11

Rab4 presenta una distribución compartida con Rab5 y Rab11 en endosomas tempranos y de reciclamiento, respectivamente. Rab4 regula el reciclamiento rápido de receptores desde los endosomas tempranos, en donde los receptores son desfosforilados, a la membrana plasmática.

Por otro lado, Rab11 controla el reciclamiento lento de los receptores que se translocan desde los endosomas tempranos, primero al compartimento pericentriolar de reciclamiento y después a la membrana plasmática. De esta manera, Rab11 se encuentra localizada en endosomas tempranos, endosomas perinucleares y en la red trans-Golgi (TGN), y se considera que además de controlar el reciclamiento lento de GPCRs también regula el tráfico de los receptores hacia el aparato de Golgi (Seachrist & Ferguson 2003).

Rab7

Después de la estimulación crónica, algunos GPCRs son dirigidos hacia lisosomas para la subsecuente degradación proteolítica. Rab7 se encuentra localizada en endosomas tardíos y, parcialmente, en compartimentos lisosomales, por lo que se ha propuesto que esta proteína regula el tráfico de los receptores de endosomas tempranos a endosomas tardíos y, subsecuentemente, a lisosomas (Seachrist & Ferguson 2003).

Proteínas asociadas a lisosomas (LAMP)

A pesar de que Rab7 puede servir para la identificación de lisosomas, estas estructuras contienen otros marcadores que permiten su caracterización exclusiva. Dos de los componentes más abundantes en los lisosomas, son las proteínas asociadas a lisosomas LAMP-1 y LAMP-2, que presentan una homología considerable y tienen estructura y propiedades bioquímicas similares. Las LAMPs son proteínas transmembranales involucradas en la autofagia y la biogénesis lisosomal, que contienen un dominio luminal altamente glicosilado y una cola citoplasmática corta. Esta estructura parece funcionar para mantener la integridad estructural de la membrana de los lisosomas, protegiéndola del ambiente luminal que podría llevar a su degradación (Huynh et al. 2007).

1.12 Tráfico vesicular del receptor CB₂

Como se mencionó anteriormente, el receptor CB₂ ha surgido como un blanco terapéutico para la regulación de distintas condiciones inflamatorias debido a su alta expresión en distintas células del sistema inmunológico y los efectos anti-inflamatorios de los cannabinoides. Por esta razón, el estudio de las vías del tráfico intracelular, que pueden funcionar como un indicativo de la activación de los receptores CB₂ y el conocimiento de la distribución subcelular de los mismos, son importantes para conocer la capacidad de sus ligandos para generar respuestas que pudieran tener carácter terapéutico. Existe poca información acerca del tráfico vesicular del receptor CB₂ en células del sistema inmunológico y en otros modelos celulares; sin embargo, se sabe que estos receptores se internalizan rápidamente en respuesta a la exposición a un agonista en vesículas positivas a Rab5 y que los receptores internalizados se reciclan lentamente por la vía dependiente de Rab11 (Grimsey et al. 2011). Sin embargo, es importante mencionar que estos estudios se han realizado en modelos celulares en los que se induce la sobre-expresión de los receptores y de las proteínas Rab, por lo que estos resultados pueden cambiar en líneas celulares primarias, en las que no se modifica la expresión de ninguna de estas proteínas (Kleyer et al. 2012).

2 JUSTIFICACIÓN

La tolerancia al LPS bacteriano es un fenómeno de gran importancia para comprender el mecanismo mediante el cual el sistema inmunológico deja de responder ante un estímulo continuo. El estudio de los procesos que llevan al desarrollo y establecimiento de este fenómeno se ha enfocado en la descripción de proteínas que inhiben la vía de señalización del receptor TLR4.

Los eCN son moléculas que se sintetizan en respuesta a una sobre-estimulación de varios tipos celulares y tienen la capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria en las CC. Se desconoce si la activación continua del receptor TLR4 por el LPS bacteriano puede llevar a la producción de eCN y si éstos pueden contribuir al desarrollo de tolerancia.

3 HIPÓTESIS

La estimulación continua del receptor TLR4 en CC llevará a la producción de 2-AG el cual, al actuar de forma autocrina, participará en el desarrollo del estado de hiporrespuesta que se genera por la exposición constante de las CC al LPS bacteriano, contribuyendo al fenómeno de tolerancia a la endotoxina *in vitro* y participando en los fenómenos anti-inflamatorios en un modelo *in vivo*.

4 OBJETIVO GENERAL

Identificar si el 2-AG participa en la inducción de la tolerancia al LPS bacteriano en CC *in vitro* y si es capaz de modular las respuestas inflamatorias en un modelo *in vivo*.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la presencia y localización de los receptores a cannabinoides, CB₁ y CB₂, en BMMCs.
2. Analizar si el 2-AG induce el desarrollo de tolerancia a la endotoxina de manera similar al LPS bacteriano.

3. Identificar el receptor que media los efectos del 2-AG en el fenómeno de tolerancia al LPS bacteriano, mediante la utilización de antagonistas específicos para los receptores CB₁ y CB₂.
4. Estudiar el mecanismo de inhibición del 2-AG sobre algunos puntos del proceso de secreción de citocinas en respuesta a la estimulación del TLR4 con LPS.
5. Identificar la producción de 2-AG por las BMMCs en respuesta a la estimulación con LPS bacteriano.
6. Analizar el tráfico vesicular de los receptores a cannabinoides en respuesta al LPS.
7. Evaluar el papel del 2-AG en la secreción del TNF α inducido por LPS en un modelo *in vivo*.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Metodología

6.1.1 Animales

Se utilizaron ratones silvestres de 4 a 6 semanas de edad, tanto de la cepa C57BL/6J silvestres (wild type, WT; No. de stock 000664) como ratones deficientes de células cebadas (*c-Kit*^{Wsh/Wsh} No. de stock 005051) y ratones deficientes del receptor TLR4 (TLR4^{-/-}; No. de stock 007227), provenientes de Laboratorios Jackson (Maine, USA). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22-24 °C) y humedad, con libre acceso a alimento y agua. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con nuestro Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), el cual sigue las reglas de la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Para cada procedimiento experimental, se utilizaron protocolos previamente autorizados con los números 137-15, 23-12 y 75-13.

6.1.2 Sustancias, reactivos y anticuerpos

Se utilizó una IgE de ratón (SPE7 de Sigma) específica para el reconocimiento de dinitrofenol unido a albúmina sérica humana (DNP-HSA; SIGMA cat. A6661). Los anticuerpos utilizados para la realización de esta tesis fueron los siguientes: receptor CB₁ (sc-10066), receptor CB₂ (sc-25494), p-AKT_{Ser473} (sc-7985-R), p-ERK 1/2 (sc-7976), p-p38 (sc-11852), ERK 2 (sc-154), β-actina (sc-81178), SHIP-1 (sc-8425), IRAK-M (sc-100389), β-arr2 (sc-13140), Rab11A (sc-166523), Rab7 (sc-271608) y LAMP-2 (sc8100) los cuales son de la casa comercial Santa Cruz Biothechnology. Los anticuerpos para la identificación de p-IKK (cat #2697) y p-p65 (cat #3033) pertenecen a Cell Signaling Technology, y el anticuerpo para EEA-1 se obtuvo de eBioscience. Los anticuerpos secundarios utilizados para el inmunoblot fueron una IgG acoplada peroxidasa de rábano que reconoce anticuerpos provenientes de ratón y una IgG acoplada peroxidasa de rábano que reconoce anticuerpos provenientes de conejo (Jackson Immunoresearch). Para la inmunofluorescencia, los anticuerpos secundarios utilizados fueron para el reconocimiento de proteínas provenientes de: ratón acoplado a Alexa Fluor 488, conejo acoplado a Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 647 y de cabra acoplado a Alexa Fluor 647. Todos estos anticuerpos se obtuvieron de Life Technologies.

Los reactivos para los cultivos celulares y el Western Blot se compraron en Sigma Aldrich e Invitrogen. El 2-AG disuelto en acetonitrilo, el LPS (serotipo 026:B6) y el antagonista para el receptor CB₁, el AM251, son de la marca Sigma Aldrich. El antagonista para el receptor CB₂, AM630, se compró en Tocris Bioscience. Ambos antagonistas fueron disueltos en etanol al 100% antes de su uso. Los kits de ELISA para la detección de TNF α y 2-AG fueron de la marca Novex (Life Technologies) y Cloud-Clone Corp., respectivamente. El inhibidor de la monoacil-glicerol lipasa (MAGL), el MNJ110 se obtuvo de Calbiochem.

6.1.3 Obtención y cultivo de CC de origen murino

Los ratones WT y TLR4^{-/-} fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ y se obtuvo la médula ósea de las tibias mediante el lavado con medio de cultivo RPMI-1640 (Biofluids) (SIGMA, cat. R4130-1L), complementado con L-glutamina (SIGMA, cat. R4130). La preparación del medio RPMI se realizó como se menciona a continuación: 20 ng/ml de IL-3 (Preprotech, cat. 213-13), 1X de aminoácidos no esenciales (NEAA 100 X; Biofluids, #cat. 332-100), 50 μM de β-mercaptoetanol (SIGMA, # cat. M6250), 25 nM del buffer HEPES (1M, pH 7.7; SIGMA, # cat., H7006), 10% de suero bovino fetal (FBS, GIBCO, _BRL cat. 261400779), 1 mM de piruvato de sodio (stock 100 mM, Biofluids, # cat. 33-100), 1U/ml de penicilina-0.1 mg/ml de estreptomina (Gibco, # cat. 1378-016) y 1X de antimicótico (stock 100X Gibco, # cat. 15240062). En algunos casos, se añadió SCF a una concentración de 10 ng/ml. El medio de cultivo se esterilizó con unidades de filtración de 0.2 μm. La médula ósea se disgregó en cajas Petri estériles a las cuales se les añadió medio de cultivo RPMI. Posteriormente, la médula extraída se colocó en cajas de cultivo Nunc T-75 con 30 ml de medio de cultivo RPMI, y se colocaron en incubadora BINDER® a 37 °C, con una atmósfera de CO₂ al 5%, realizando cambios de medio semanalmente. Después de 4 a 6 semanas de cultivo, se comprobó el fenotipo celular mediante la expresión del receptor FcεRI en la membrana citoplasmática de las células por citometría de flujo.

6.1.4 Citometría de flujo

Se incubaron 2 millones de CC con 100 ng/ml de IgE monoclonal anti-DNP (SIGMA, # cat. D 8406) a 37 °C durante 1 h en 1 ml de medio RPMI. Posteriormente, las CC se dividieron en dos alícuotas de 400 μl cada una; una se utilizó para el control de isotipo y la otra, para el anticuerpo anti-IgE marcado. Se agregó 1 ml de buffer de tinción (PBS pH 7.4; 5 g de albúmina de suero bovino, BSA y 0.5 de azida de sodio) a cada muestra, las cuales se centrifugaron a 1 500 rpm durante 5 min y se les retiró el sobrenadante. Los botones celulares se incubaron con 250 μl del reactivo Fc Block (dilución 1:100) en el buffer de tinción a 4 °C por 5 min, con la finalidad de bloquear los receptores para las

fracciones Fc de los anticuerpos. Después, al tubo de control de isotipo se le agregaron 250 μ l del anticuerpo anti IgG1 de rata, conjugado con FITC, en una dilución 1:50 en el buffer de tinción. A las células con anti-IgE, se les agregaron 250 μ l del anticuerpo anti-IgE de ratón, conjugado con FITC (BD Biosciences, # cat 553415). Ambos tubos se incubaron a 4 °C, durante 30 a 60 min, protegidos de la luz. Posteriormente, los tubos se centrifugaron, se retiraron los sobrenadantes y las células se re-suspendieron en 500 μ l de buffer de tinción, para finalmente analizarlas por citometría de flujo en el equipo FACSort (Becton Dickinson) ubicado en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE), en el Cinvestav de la Unidad Zacatenco. Los cultivos que mostraron más del 95% de células positivas para el receptor Fc ϵ RI, se utilizaron para los experimentos que se describen a continuación.

6.2 Parámetros evaluados

6.2.1 Ensayo de desgranulación de BMMCs

Se midió la actividad de la enzima β -hexosaminidasa como determinante de la desgranulación de las BMMCs y como parámetro para evaluar la capacidad de respuesta a estímulos de los cultivos de BMMCs antes de utilizarlos en cada experimento. En general, se utilizaron 2×10^6 células en el ensayo por tratamiento en 1 ml de amortiguador Tyrode-BSA durante la estimulación. Las BMMCs WT y TLR4^{-/-} ya estimuladas durante 1 h con DNP-HSA (SIGMA cat. A6661) se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C y se determinó el porcentaje de liberación de la enzima β -hexosaminidasa.

La determinación de la enzima β -hexosaminidasa se realizó midiendo la hidrólisis del p-nitrofenil- β -D-2-acetamido-2-desoxiglucopiranosido (p-NAG, SIGMA). Esta reacción provoca la formación de un producto colorido que es directamente proporcional a la actividad enzimática. La cantidad de para-nitrofenol oxidado producido se determinó agregando 40 μ L de p-NAG (1 mM) en cada pozo de una de las placas de ELISA y, posteriormente, agregando 60 μ L del sobrenadante de cada muestra. La placa de ELISA se incubó por 1 h a 37 °C y, una vez transcurrido este tiempo, la reacción fue detenida

con 120 μ L del amortiguador $\text{NaCO}_3/\text{NaHCO}_3$ a $\text{pH}=11.0$. Finalmente, se midió la reacción mediante espectofotometría, utilizando un lector de ELISA (Tecan Sunrise) a una longitud de onda de 405 nm. El porcentaje de desgranulación se obtuvo tomando como 100% la lectura de células que fueron tratadas igual que todas las muestras, pero a las que no se les adicionó ningún tratamiento y, en su lugar, fueron tratadas con TritónX-100 al 0.5%. El porcentaje de desgranulación se calculó utilizando la siguiente fórmula:

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

6.2.2 RT-PCR

Purificación de RNA

La extracción y purificación de RNA total se llevó a cabo mediante el método de TRI-Reagent (SIGMA). Después de la sensibilización, la pastilla de células se homogenizó con 1 ml de TRI-Reagent a temperatura ambiente, pipeteando vigorosamente durante 2 min. Posteriormente, el homogeneizado se transfirió a un tubo nuevo con tapa de rosca, se le añadieron 200 μ l de cloroformo y se mezcló en el vórtex. La mezcla se dejó en reposo hasta que las dos fases se separaron, después de esto se centrifugaron a 14 000 rpm, a 4 °C, por 15 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo estéril, al cual se le añadieron 3 μ l de glucógeno (SIGMA cat. 9510) y 500 μ l de isopropanol frío (SIGMA, cat. I9516). A continuación, se permitió que la mezcla se precipitara durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14 000 rpm, durante 10 min, a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron y los botones celulares se lavaron con 1 ml de etanol frío al 75%, en agua tratada previamente con dietilpirocarbonato (AMBION), y se centrifugaron a 14 000 rpm, durante 10 min, a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante con vacío y cada pastilla de RNA total se disolvió en 15 μ l de una suspensión de mantenimiento de RNA (AMBION); se incubó en baño María a 60 °C, al menos durante 10 min. A continuación, se midió la densidad óptica a 260 nm, usando 1 μ l del RNA extraído y se realizó el cálculo de la cantidad de RNA obtenida, utilizando la relación que se presenta a continuación:

1_{UA260}= 40 µg/ml RNA

Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

RT-PCR

Para realizar la retrotranscripción (RT) del RNA, se utilizó el kit de Revert Aid (Thermofisher). La reacción se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizaron 2 µl de producto de esta reacción para lograr amplificar los RNAm de los receptores CB₁, CB₂, utilizando GAPDH como gen control. La secuencia de oligonucleótidos para los receptores CB₁ y CB₂ se obtuvieron de lo reportado por Jiang et al. 2007 y se compraron en Sigma. Las secuencias para la amplificación de los receptores a cannabinoides fueron las siguientes: CB₁, sentido, 5'-CGTGGGCAGCCTGTTCCCTCA-3'; antisentido, 5'-CATGCGGGCTTGGTCTGG-3'; CB₂ sentido 5'-CCGGAAAAGAGGATGGCAATGAAT-3'; antisentido 5'-CTGCTGAGCGCCCTGGAGAAC-3'. Para la GAPDH, las secuencias de los oligos fueron las siguientes: sentido 5'-TGA-AGG-TCG-GTG-TGA-ACG-GAT-TTG-GC-3' y antisentido 5'-CAT-GTA-GGC-CAT-GAG-GTC-CAC-CAC-3'.

Estos genes se amplificaron bajo las condiciones que se describen a continuación: 95 °C por 5 min, apertura de cadenas a 95 °C por 45 s, alineamiento de oligos a 58.4 °C (CB₁) o 60.9 °C (CB₂) por 1 min y extensión a 72 °C por 45 s. El ciclo se repitió 35 veces antes de una etapa final de 7 min a 72°C.

Las muestras se analizaron mediante electroforesis, en un gel de agarosa a 2% en TBE; se tiñeron con bromuro de etidio (Mercury) y se visualizaron con luz UV. Para conocer la longitud de las bandas obtenidas, se utilizó el marcador de tamaño de DNA (ThermoFisher). El análisis densitométrico de las bandas se hizo a partir de la imagen capturada por el equipo MiniBis Pro de Biolmaging Systems.

6.2.3 Western Blot

Dos millones de BMMCs, por condición, se trataron con diferentes estímulos a distintos tiempos a 37 °C. Una vez finalizada la estimulación celular, las muestras se centrifugaron a 5 000 rpm durante 5 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante con vacío. A los botones celulares se les añadieron 150 µl de Laemmli 1X, 20 µl/ml de β-mercaptoetanol y 20 µl/ml de orto-vanadato de sodio, que tenía una concentración inicial de 200 nM. Los extractos se sometieron a ebullición por 15 min y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para realizar la electroforesis, las muestras se colocaron en ebullición durante 15 min, posteriormente se tomaron de 10 µL de cada una de las muestras y se cargaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 8% y 10%, respectivamente, con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo al protocolo de Invitrogen. Las muestras se corrieron a 50 mA en un amortiguador de TRIS-glicina-SDS, con un pH 8.3, durante aproximadamente 2 h. Una vez que finalizó la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (PerkinElmer, Polyscreen, cat. NEF1002001PK). El sándwich de transferencia se realizó de acuerdo al protocolo de Invitrogen y se empleó un amortiguador Tris-glicina, pH 8.3, con metanol frío. La transferencia se realizó a 25 V con 400 mA de corriente durante 1 h. Al finalizar la transferencia se bloqueó la membrana de PVDF con leche descremada al 5% (Svelty de Nestlé) disuelta en amortiguador salino de Tris adicionado con 0.1% de Tween (TBS-T) 1X, durante 1 h. Al finalizar este paso, la membrana se incubó a 4 °C y en agitación con los anticuerpos primarios, a las concentraciones que se describen a continuación: p-AKT_{Ser473} 1:1000; SHIP 1:5000; IRAK-M 1:3000; p-IKK 1:5000; p-p65 1:5000; p-ERK 1:10000 y p-p38 1:5000. Después de esta incubación, las membranas de PVDF se lavaron dos veces, durante 10 min, con 20 ml TBS-T 1X. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario acoplado a HRP, durante 1 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron nuevamente las membranas en dos ocasiones con 20 ml de TBS-T 1x durante 10 min por cada lavado, y se procedió a la detección de la proteína, por medio de las soluciones para la reacción de quimioluminiscencia BM Chemiluminiscense Western Blotting Mouse/Rabbit de Roche (cat. 11520709001).

Finalmente, las membranas fueron expuestas a placas de rayos X de KODAK, de 1 a 15 min. La cuantificación de los blots se realizó mediante el análisis de la densitometría, utilizando el programa Image Studio (v. 5.2.5).

6.2.4 ELISA

Análisis de la secreción de TNF α

Para determinar la concentración extracelular de TNF α , se realizó la técnica de ELISA en los sobrenadantes celulares o en lavados peritoneales de ratones. Las células sensibilizadas con IgE (2×10^6 por condición) o los lavados peritoneales se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min, a 4 °C para la recolección del sobrenadante, que se refrigeró a - 80 °C hasta su uso. La cuantificación del TNF α secretado se realizó mediante un kit de ELISA (Novex, Lifetechnologies), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Análisis de la secreción de 2-AG

Las células de ratones WT o TLR4 $^{-/-}$, sensibilizadas con IgE (3×10^6 por condición), se pre-incubaron con 1 μ M del inhibidor de la enzima MAGL, MNJ110, por 15 min, a 37 °C. Posteriormente, las células fueron incubadas a distintos tiempos con 500 ng/ml de LPS, se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min, y los sobrenadantes fueron recolectados y refrigerados a - 80 °C hasta su uso. La cuantificación de la producción de 2-AG se realizó mediante un kit de ELISA (Cloud-Clone Corp.), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

6.2.5 Inmunofluorescencia

Para realizar este procedimiento, los portaobjetos de cristal se cubrieron con fibronectina a una concentración 10 μ g/ml y se incubaron a 37 °C, por 30 min. Una vez concluido este tiempo, los portaobjetos se lavaron en dos ocasiones con amortiguador salino de fosfatos (PBS) y se guardaron a 4 °C hasta su uso. Las BMMCs cultivadas en medio con SCF y sin sensibilizar, se incubaron en ausencia o presencia de 500 ng/ml de LPS a diferentes tiempos. Después, las células se colocaron en las laminillas cubiertas con fibronectina

durante 45 min, para lograr la adhesión de las células. Finalizando el tiempo de adhesión, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 15 min y, posteriormente, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con cloruro de amonio por 10 min, para bloquear los grupos aldehído que se forman después de la fijación y evitar la autofluorescencia. Después de dos lavados con PBS, las células se bloquearon durante 1 h con solución de bloqueo, compuesta de 1% de BSA, 5% de suero de burro y 0.1% de Tween20. Concluido el tiempo de bloqueo, las células se co-incubaron con anticuerpos primarios específicos durante toda la noche. Los anticuerpos primarios empleados, y las concentraciones utilizadas fueron los siguientes: CB₂ 1:50, βarr2 1:50; EEA-1 1:100; Rab11 1:100; Rab7 1:200 and LAMP-2 1:100. En todos los casos, las células fueron incubadas con el anticuerpo CB₂, en presencia de alguno de los otros anticuerpos. Al siguiente día, las laminillas se lavaron en 10 ocasiones con PBS y los anticuerpos secundarios correspondientes se adicionaron a las células, a una concentración 1:200 durante 2 h. Después de lavar los anticuerpos secundarios con PBS en 15 ocasiones, las células se incubaron con 4',6 diamino-2-2 fenilindol (DAPI) a una concentración de 300 nM por 5 min, para la tinción de los núcleos. El DAPI se eliminó de las laminillas realizando 5 lavados con PBS. Finalmente, se añadió el reactivo Prolong Gold (Thermo Fisher Scientific), con la finalidad de evitar el desvanecimiento de la señal fluorescente y las laminillas se sellaron con esmalte transparente. Las células fueron analizadas por microscopía confocal utilizando un microscopio Carl-Zeiss LSM780. La co-localización de las marcas fluorescentes se determinó utilizando el coeficiente de Manders, mediante el programa Image J V1.51m9.

6.2.6 Reconstitución de ratones deficientes de células cebadas

Los ratones deficientes de CC (*c-Kit*^{Wsh/Wsh}, Wsh), con fondo genético de ratones C57BL/6J, se mantuvieron en condiciones estériles en la UPEAL del Cinvestav Zacatenco de acuerdo a lo recomendado por el proveedor. Para la reconstitución de los ratones Wsh con CC, se siguieron los protocolos reportados por Grimbaldeston et al. 2005 y Madera-Salcedo et al. 2013. De forma general, 2x10⁶ BMDCs, provenientes de ratones WT o TLR4^{-/-}, se inyectaron intraperitonealmente a ratones Wsh de 8 semanas

de edad. Los ratones Wsh reconstituídos (Wsh rec) se utilizaron 4 semanas después de la reconstitución para el diseño experimental que se mencionará más adelante.

6.2.7 Obtención de lavados peritoneales

Los ratones WT, Wsh y Wsh rec que recibieron los distintos tratamientos se sacrificaron 1 h después en una cámara de CO₂. Posterior al sacrificio, a cada ratón se le administró 2 ml de solución salina, por vía intraperitoneal (i.p.), y se les realizó un masaje ligero en la superficie abdominal. Inmediatamente después, se recuperó el contenido peritoneal con una jeringa estéril, que se centrifugó a 10 000 rpm, por 10 min, a 4 °C. Los botones celulares se desecharon y los sobrenadantes se guardaron a - 80 °C hasta su uso en la técnica de ELISA.

6.3 Diseño experimental

6.3.1 Análisis del establecimiento de tolerancia con 2-AG

Para establecer si el 2-AG inducía tolerancia a la endotoxina, las BMMCs sensibilizadas durante 24 h con IgE fueron estimuladas con 10 nM de 2-AG durante 0, 1 o 2 h. Como control, se utilizaron células estimuladas con 500 ng/ml de LPS a los mismos tiempos. Una vez finalizados los tiempos de estimulación, las células se lavaron y se incubaron en medio RPMI nuevo con 500 ng/ml de LPS, durante 3 h. Finalmente, las células se recolectaron y se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min; los sobrenadantes se recuperaron y se guardaron a – 80 °C hasta su uso para el análisis de la secreción de TNF α por la técnica de ELISA. La concentración de 2-AG se seleccionó con base en las concentraciones del eCN producidas por distintos tipos celulares, con la finalidad de obtener una respuesta similar a lo que podría ocurrir fisiológicamente (Berdyshev et al. 2001; Di Marzo et al. 1999; Gonsiorek et al. 2000).

6.3.2 Análisis de la expresión de los receptores a cannabinoides

Dos millones de BMMCs, previamente sensibilizadas con IgE, fueron centrifugadas y lisadas con buffer Laemmli 1X o con Trizol, para la realización de WB o extracción de RNA, respectivamente.

6.3.3 Análisis de la fosforilación de proteínas en respuesta al 2-AG

Las BMMCs (2×10^6 células por condición) fueron estimuladas con 1, 10, 100 y 1000 nM de 2-AG por 15 min y se analizó la fosforilación de AKT y ERK1/2 por Western-Blot. Como control, se utilizaron células sin estimular, células expuestas al vehículo del 2-AG (acetonitrilo) y células estimuladas con 27 ng/ml de DNP-HSA. Las concentraciones empleadas del eCN se mantuvieron en el rango nM para mimetizar la cantidad de 2-AG que se produce de forma endógena en diferentes células y con la finalidad de evitar la activación de receptores distintos a los receptores a cannabinoides.

6.3.4 Análisis del efecto de los antagonistas de los receptores CB₁ y CB₂ en el establecimiento de la tolerancia por 2-AG

Dos millones de BMMCs por condición, previamente sensibilizadas durante 24 h fueron estimuladas durante 15 min con distintas concentraciones (3, 10 y 30 nM) de los antagonistas para los receptores a cannabinoides. Como antagonista del receptor CB₁ se utilizó el compuesto AM251 y como antagonista del receptor CB₂, el AM630. Posteriormente, las células se incubaron con 10 nM de 2-AG, durante 2 h, a 37 °C. Una vez concluido este tiempo, las células se centrifugaron a 1 500 rpm durante 5 min, se resuspendieron en medio RPMI nuevo y se estimularon con 500 ng/ml de LPS por 3 h. Como grupo control se utilizaron células incubadas por 15 min con los antagonistas en presencia del vehículo del 2-AG (acetonitrilo); posteriormente, se centrifugaron a 1 500 rpm, por 5 min y se resuspendieron en medio RPMI nuevo, al cual se le agregaron 500 ng/ml de LPS durante 3 h. Finalizado el tiempo de incubación con la endotoxina, todas las células se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min y se recolectó el sobrenadante, el

cual se almacenó a – 80 °C hasta el análisis de la secreción de TNF α mediante la técnica de ELISA.

6.3.5 Análisis de la secreción de 2-AG en respuesta al LPS

Tres millones de BMMCs de ratones WT y TLR4^{-/-} por condición, previamente sensibilizadas, se pre-incubaron durante 15 min con 1 μ M de MNJ110, inhibidor de la MAGL (enzima que degrada el 2-AG), a 37 °C. Posteriormente, las células se estimularon por 5, 10, 15, 30 y 45 min con 500 ng/ml de LPS y una vez concluidos los tiempos de estimulación, se centrifugaron a 10 000 rpm, por 10 min, a 4 °C y el sobrenadante se recolectó para analizar la secreción de 2-AG mediante la técnica de ELISA.

6.3.6 Análisis de la inhibición en la fosforilación de proteínas

Las BMMCs (2x10⁶ células por condición) se sensibilizaron por 24 h con 100 ng/ml de IgE. Al siguiente día, las células se pre-incubaron durante 15 min, 1 o 2 h con 10 nM de 2-AG. Como control, se utilizaron células pre-incubadas por 2 h con LPS y células incubadas con vehículo. Una vez concluidos los tiempos de pre-incubación, las células se estimularon durante 15 min con 500 ng/ml de LPS. Finalmente, las células se centrifugaron a 5 000 rpm por 5 min, y los botones celulares se lisaron con Laemmli 1X para su análisis por Western Blot. Se estudió la fosforilación de IKK, p65, ERK y p38.

6.3.7 Análisis de la expresión de marcadores de tolerancia

Dos millones de BMMCs por condición (WT o TLR4^{-/-}), se estimularon con 10 nM de 2-AG o 500 ng/ml de LPS durante 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 18, o 24 h a 37 °C. Después, las células se centrifugaron a 5 000 rpm durante 5 min a 4 °C y las pastillas celulares se lisaron con buffer Laemmli 1x y se analizó la expresión de SHIP e IRAK-M por Western Blot.

6.3.8 Análisis del efecto del inhibidor de SHIP sobre la secreción de TNF α

Dos millones de BMDCs por condición, se incubaron en presencia de vehículo o 10 μ M del inhibidor de SHIP, 3 α -Aminocolestano (3-AC, Merck cat# 565835), por 15 min a 37°C. Posteriormente, las células se estimularon con 10 nM de 2-AG o 500 ng/ml de LPS por 2 h. Después de estos tratamientos, las células se centrifugaron a 10 000 rpm, por 10 min, y los botones celulares se resuspendieron en medio RPMI nuevo y se estimularon con 500 ng/ml de LPS, durante 3 h. Finalmente, las células se recolectaron y se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min; los sobrenadantes se recuperaron y se guardaron a - 80 °C hasta su uso para el análisis de la secreción de TNF α por la técnica de ELISA.

6.3.9 Análisis de la co-localización de proteínas con el receptor CB₂

Un millón de células por condición, cultivadas con SCF y sin sensibilizar, se estimularon a distintos tiempos con 500 ng/ml de LPS. Para el análisis de la co-localización del receptor CB₂ con β -arr2 y con endosomas tempranos (EEA-1), las células se estimularon con LPS durante 30 min o 4 h. Para el estudio de la co-localización del receptor CB₂ con endosomas de reciclamiento (Rab11), las células se incubaron con la endotoxina por 4 h. Finalmente, para el análisis de la co-localización del receptor CB₂ con endosomas tardíos (Rab7) y lisosomas (LAMP-2), las células se estimularon con la endotoxina por 4 y 7 h. En todos los casos, las células se trataron para su análisis por inmunofluorescencia.

6.3.10 Análisis del efecto de 2-AG *in vivo*

Ratones WT, Wsh y Wsh rec, se inyectaron, por vía i.p. con distintas dosis de 2-AG (0.03, 0.1, 0.3 o 1 mg/kg) e inmediatamente después se les administró 1 mg/kg de LPS por la misma vía. Una hora después de la administración, los ratones se sacrificaron, se realizaron los lavados peritoneales y se obtuvieron los sobrenadantes para analizar la secreción de TNF α por el método de ELISA.

6.4 Análisis estadístico

Todos los datos se muestran como la media \pm el error estándar de al menos 3 experimentos independientes, utilizando diferentes cultivos celulares. Para los experimentos *in vivo* se utilizaron al menos 4 animales por tratamiento. Para comparaciones entre dos grupos, se utilizó la t de Student pareada y para comparaciones múltiples se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías seguidos de pruebas post-hoc específicas. El análisis estadístico se realizó en todos los casos utilizando el programa GraphPad Prism (v.7.0).

7 RESULTADOS

7.1 El 2-AG induce tolerancia a la endotoxina de manera similar al LPS

Diferentes estudios han demostrado que los eCN son capaces de inhibir la liberación de citocinas inducida por LPS; sin embargo, este efecto ha sido evaluado en células monocíticas y células dendríticas y como una respuesta aguda, y no existen estudios que muestren que las acciones de los eCN, el 2-AG en particular, estén relacionadas con el establecimiento de la tolerancia al LPS bacteriano.

La tolerancia a la endotoxina ha sido determinada en distintas células del sistema inmune, y definida como una disminución en la secreción de citocinas ante un segundo reto con LPS. Por esta razón, en este proyecto se analizó el efecto del 2-AG sobre la secreción de TNF α inducida por LPS. Para analizar el efecto de este eCN, primero establecimos el tiempo en el que se desarrolla la tolerancia en respuesta al propio LPS. En las barras negras de la **Figura 12** se muestra el curso temporal del establecimiento de la tolerancia con 500 ng/ml de LPS (grupo control de inducción clásica de tolerancia) que como se observa es de 2 h. Tomando esta curva como referencia, se realizó el mismo experimento utilizando como primer estímulo 10 nM de 2-AG, seguido del segundo estímulo con LPS. En barras blancas de la **Figura 12** se puede observar que

después de 2 h de estimulación, el 2-AG es capaz de inhibir la secreción de TNF α inducida por LPS de una manera similar a como lo hace la endotoxina.

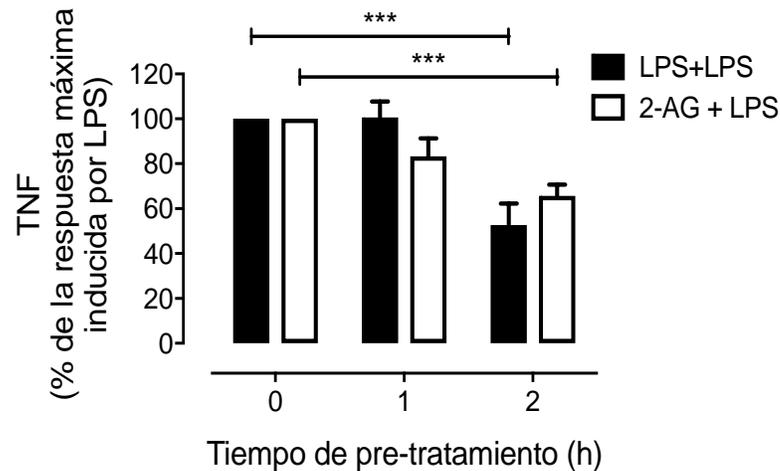


Figura 12. El 2-AG disminuye la secreción de TNF α de manera similar al LPS. Secreción de TNF α en respuesta a la estimulación con 500 ng/ml de LPS (barras negras) o 10 nM de 2-AG (barras blancas) a los tiempos indicados en la gráfica y un estímulo posterior con 500 ng/ml de LPS durante 3 h. ***p<0.001 ANOVA de una vía seguida de Dunnett.

7.2 Las BMBCs expresan a los receptores a cannabinoides CB₁ y CB₂

Se realizó el análisis de la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ a nivel de RNAm y de la proteína. En la **Figura 13** se muestran los resultados del RNAm. Con respecto a la identificación del receptor CB₁ el producto que se obtuvo después de realizar la PCR fue de 403 pares de bases (pb). Por otro lado, en la misma Figura se observa que el producto de la PCR obtenido para el receptor CB₂ fue de 479 pb. En ambos casos, la longitud de las bandas obtenidas concuerda con lo reportado anteriormente utilizando los mismos cebadores empleados en este estudio (McKallip, et. al., 2002).

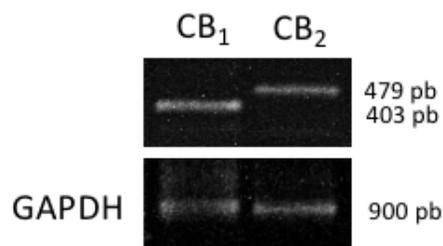


Figura 13. Las BMBCs expresan el RNAm de los receptores CB₁ y CB₂. A. Análisis de la expresión del RNAm de los receptores CB₁ y CB₂ mediante RT-PCR. Se muestra la imagen representativa de 3 experimentos independientes. Como control de la técnica, se amplificó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que se muestra en el panel inferior.

De igual manera, se realizó el análisis de la expresión de los receptores CB₁ y CB₂, a nivel de la proteína, mediante la técnica de Western-Blot. Con respecto al receptor CB₁, se obtuvo la expresión de 3 bandas, ubicadas alrededor de 64, 55 y 53 KDa, cada una de las cuales identifica al receptor con diferentes niveles de glicosilación de acuerdo a lo reportado por Song y colaboradores en 1995 (**Figura 14**). Con respecto al receptor CB₂, también se identificó su expresión en las BMMCs con un peso de 36 KDa, el cual es similar al reportado por Samson y colaboradores en el 2003 en otra línea de CC (RBL-2H3) (**Figura 14**).

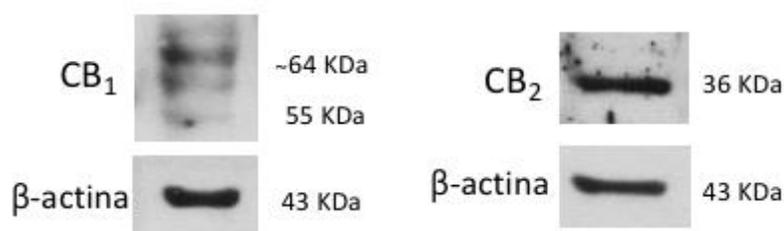


Figura 14. Las BMMCs expresan a los receptores CB₁ y CB₂ a nivel de la proteína. Análisis de la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ mediante la técnica de Western-Blot. Las BMMCs fueron sensibilizadas con IgE por 24 horas y posteriormente se lisaron con Laemmli para la identificación de los receptores. La figura muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

7.3 Los receptores CB₁ y CB₂ en BMMCs son funcionales

Se sabe que la estimulación de los receptores CB₁ y CB₂ activa la vía de las MAPK y la vía de PI3K/AKT, por acción de las subunidades βγ de la proteína G_{i/o} a la cual se encuentran acoplados. Para establecer si los receptores a cannabinoides identificados en nuestro modelo celular responden al 2-AG analizamos la fosforilación de AKT en la Ser473 y la fosforilación de ERK. Como muestra la **Figura 15** el tratamiento con 2-AG a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 nM, indujo la fosforilación de AKT y ERK. Como control positivo se empleó la estimulación con 27 ng/ml de antígeno DNP (dinitrofenol), que también indujo fosforilación, mientras que en las células sin tratamiento y en las tratadas con el vehículo del 2-AG (acetónitrilo), no se indujo la fosforilación de estas dos proteínas.

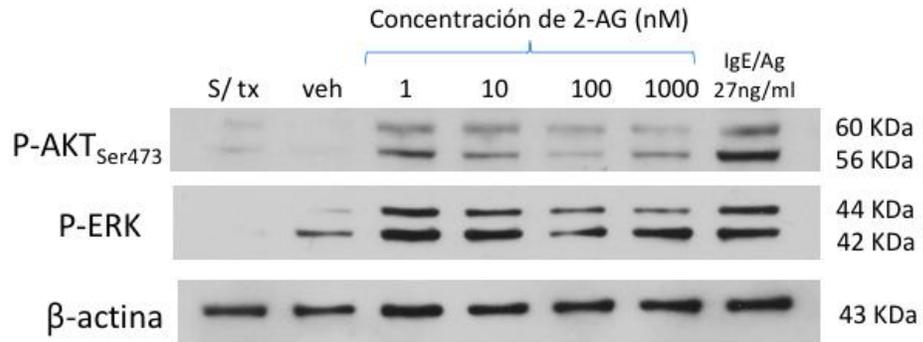


Figura 15. El 2-AG induce la fosforilación de AKT y ERK. Las BMMCs fueron estimuladas durante 15 min con 2-AG a las concentraciones indicadas en la parte superior de la figura. Se obtuvieron extractos de proteína y se analizó la fosforilación de AKT_{Ser473} y de ERK mediante el método de Western-Blot. Se muestra una imagen representativa de al menos 3 experimentos distintos.

7.4 El efecto inhibitorio del 2-AG en la secreción de TNF α inducida por LPS es dependiente del receptor CB₂

Se sabe que el 2-AG puede unirse y activar tanto al receptor CB₁ como al receptor CB₂. Debido a que el modelo celular empleado en este estudio expresa ambos receptores, y ambos son funcionales, se utilizaron antagonistas específicos para determinar cuál receptor participa en los efectos inducidos por el 2-AG sobre la secreción de TNF α . Para determinar si era el receptor CB₁, se empleó el antagonista AM251 en tres concentraciones distintas: 3 nM, 10 nM y 30 nM. Como se observa en el panel **A** de la **Figura 16** ninguna de las concentraciones del AM251 previene el efecto inducido por 2-AG.

Así mismo, se utilizó el antagonista para el receptor CB₂, el AM630, en tres distintas concentraciones: 3 nM, 10 nM y 30 nM. De acuerdo a lo mostrado en el panel **B** de la **Figura 16**, las concentraciones de 3 nM y 10 nM de este antagonista previnieron la inhibición en la secreción de TNF α inducida por el 2-AG.

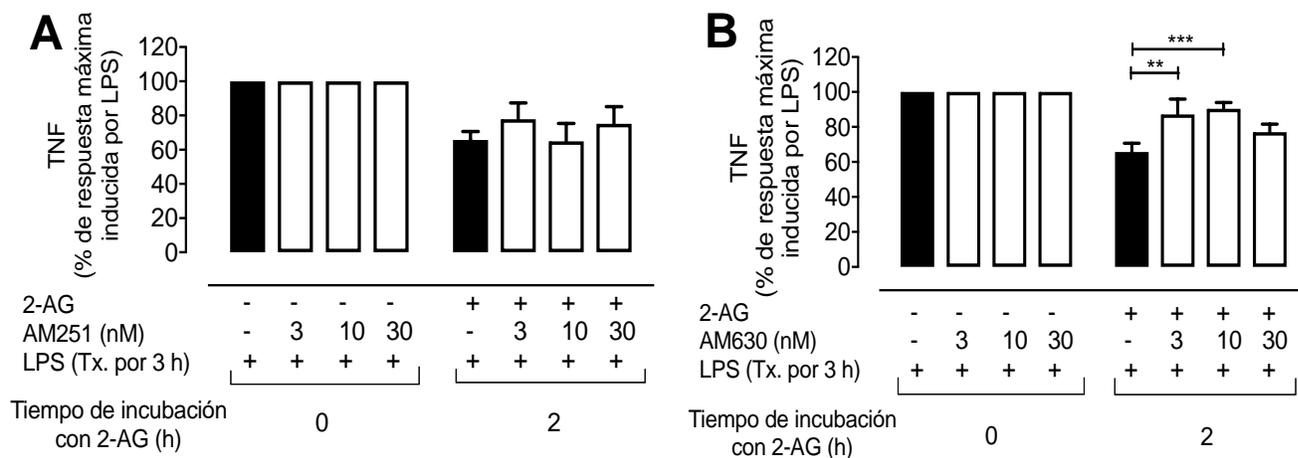


Figura 16. El antagonista del receptor CB₂, el AM630, previene el desarrollo de tolerancia al LPS inducida por 2-AG. Efecto de 10 nM de 2-AG en presencia de distintas concentraciones de AM251 (A) o AM630 (B) sobre la secreción de TNF α inducida por 500 ng/ml de LPS. Las células se incubaron durante 15 min con los antagonistas a las concentraciones indicadas en la figura y posteriormente se estimularon durante 0 y 2 h con 2-AG. Finalmente las células recibieron un estímulo con LPS durante 3 h y se realizó la medición de TNF α mediante la técnica de ELISA. ANOVA de 2 vías seguida de Tukey (**p<0.01, *** p<0.001, n=3).

7.5 La estimulación con LPS induce la secreción de 2-AG y este efecto es dependiente del receptor TLR4

Debido a que la hipótesis de este trabajo es que el LPS induce la producción de 2-AG y que éste puede actuar de forma autocrina para contribuir al desarrollo y establecimiento de la tolerancia al LPS, se midió la producción de 2-AG en BMMCs de ratones WT y TLR4^{-/-}, en respuesta a la estimulación con la endotoxina. Dado que los eCN son moléculas que se degradan rápidamente, las BMMCs se pre-incubaron durante 15 min con 1 μ M del inhibidor de la enzima MAGL MNJ110 antes de la estimulación con la endotoxina. Como se muestra en la **Figura 17**, la estimulación con 500 ng/ml de LPS induce la secreción de 2-AG, que es detectable a los 10 y 15 min y presenta una segunda ola de secreción después de los 45 min de incubación con la endotoxina. Por otro lado, en la misma figura se puede observar que la estimulación de BMMCs provenientes de ratones TLR4^{-/-} no secretan 2-AG en respuesta a la estimulación con las mismas concentraciones de LPS, a ninguno de los tiempos analizados en este trabajo.

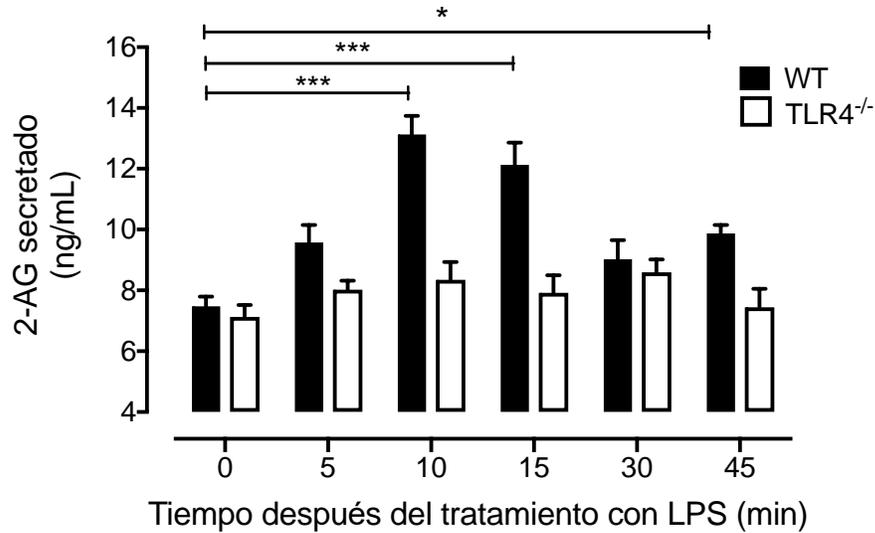


Figura 17. El LPS induce la secreción de 2-AG de forma dependiente del receptor TLR4. Las BMMCs de ratones WT o TLR4^{-/-} se incubaron con 500 ng/ml de LPS a los tiempos indicados en la gráfica, en presencia de 1 μ M del inhibidor de la MAGL, MNJ110. Finalmente, las células se centrifugaron y se colectó el sobrenadante para medir la producción de 2-AG mediante la técnica de ELISA. ANOVA de una vía seguida de Dunnett (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n = 3$).

7.6 El 2-AG inhibe la fosforilación de IKK y NF κ B, pero no inhibe la fosforilación de ERK y p38 estimulada por LPS

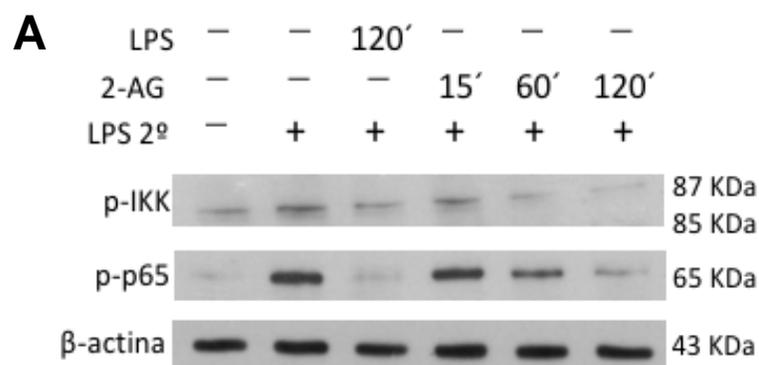
Se conoce la importancia de la participación de algunas proteínas para la secreción de citocinas pro-inflamatorias, como el TNF α , en respuesta al LPS. Madera-Salcedo y cols. en el 2013, mostraron que utilizando inhibidores específicos para la vía de las MAPK (específicamente para MEK/ERK y p38) se previene la secreción de TNF α inducida por la endotoxina. De igual manera, se sabe que la fosforilación de la cinasa IKK, en respuesta a la unión del LPS al receptor TLR4, es indispensable para la activación del factor de transcripción NF κ B y, por lo tanto, para la transcripción de genes que llevan a la producción de TNF α y otras citocinas pro-inflamatorias (Kawasaki & Kawai 2014; Avila & Gonzalez-Espinosa 2011).

Con base en lo anterior, se estudió si un pretratamiento con 2-AG era capaz de inhibir la fosforilación de las MAPK (ERK y p38), y de IKK y p65 (del factor de transcripción NF κ B) inducida por LPS, con la finalidad de conocer si los mecanismos moleculares que

participan en el efecto inhibitorio del 2-AG sobre la secreción de TNF- α inducida por LPS son las mismas que las utilizadas por la misma endotoxina.

De acuerdo a lo observado en la **Figura 18**, panel **A**, el pre-tratamiento con 10 nM de 2-AG durante 2 h disminuye la fosforilación de IKK y de p-65 en respuesta al LPS, al compararlas con las células que sólo recibieron un estímulo con 500 ng/ml de la endotoxina durante 15 min, y produce niveles de fosforilación similares a los inducidos en células tolerantes (que tuvieron un primer reto con 500 ng/ml de LPS durante 2 h y un segundo reto con la misma concentración de LPS por 15 min). El pre-tratamiento con 2-AG a tiempos más cortos (15 min y 1 h), no parece tener ningún efecto en la fosforilación de IKK inducida por LPS, sin embargo, se observa que la fosforilación de p65, sí disminuye con respecto al tiempo de incubación con el eCN.

En el panel **B** de la misma figura, se muestra el efecto del pre-tratamiento con 2-AG sobre la fosforilación de dos proteínas que pertenecen a la familia de las MAPK: ERK y p38. Se puede observar que el 2-AG no tiene efecto sobre la fosforilación de estas dos MAPK mientras que, en las células tolerantes (las pre-incubadas con LPS), sí disminuye la fosforilación de ambas proteínas.



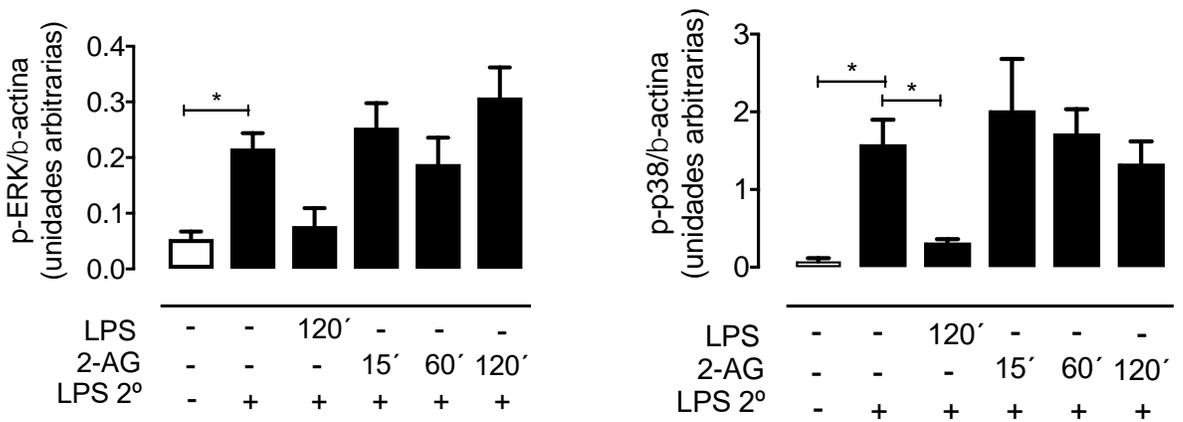
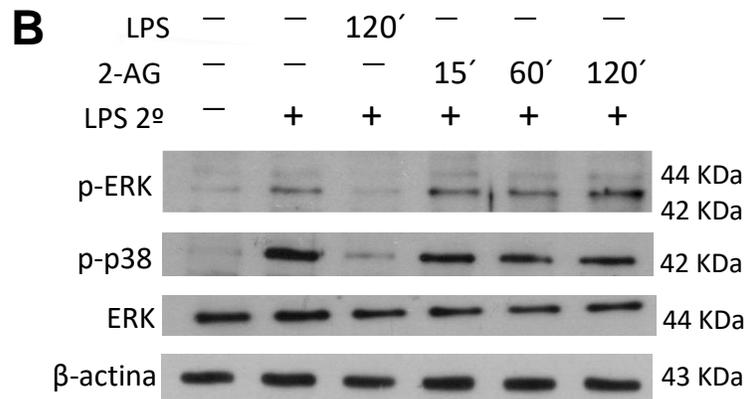
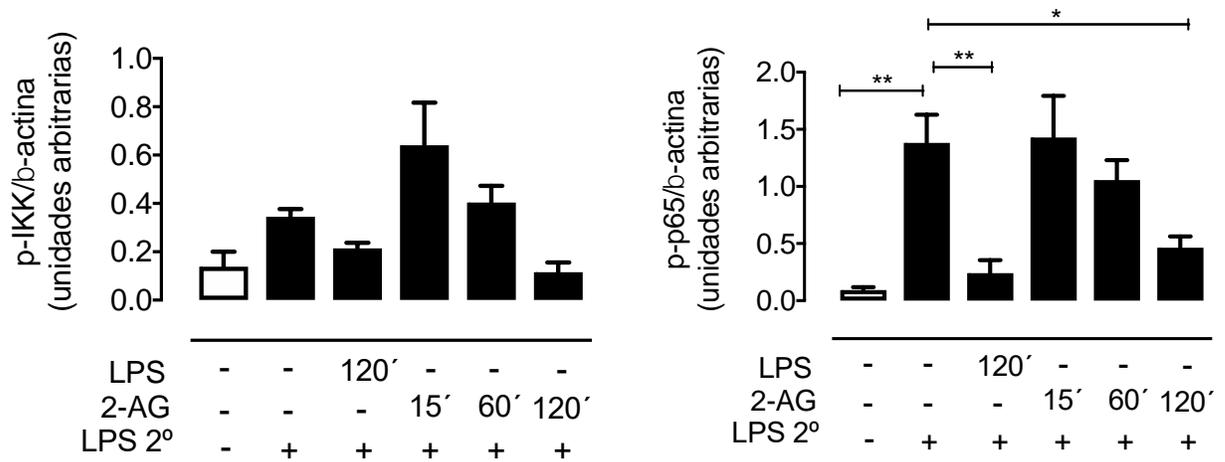


Figura 18. Un pre-tratamiento con 2-AG inhibe la fosforilación de IKK y NF κ B inducida por LPS en BMMCs. Análisis de la fosforilación de IKK y p65 (A) y ERK y p38 (B) en respuesta a un pretratamiento con 10 nM de 2-AG seguida de un estímulo con 500 ng/ml de LPS. Las células se incubaron con 2-AG durante los tiempos indicados en la figura para después recibir un estímulo con LPS durante 15 min. Como controles se utilizaron las células sin estímulo (barras blancas) y células tolerantes. Se muestra el blot representativo de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía seguida de Dunnet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

7.7 La estimulación con 2-AG induce la expresión de SHIP y de IRAK-M

Otro de los métodos que se emplean para determinar el desarrollo y establecimiento de la TE, es la expresión de diversas proteínas que inhiben la vía de señalización del receptor TLR4, conocidas como marcadores de tolerancia.

Para identificar si la inducción de los marcadores de tolerancia es otro mecanismo mediante el cual el 2-AG inhibe la vía de señalización del receptor TLR4, se analizó la expresión de las proteínas SHIP e IRAK-M. Ambos marcadores inhiben la señalización del receptor TLR4 en los primeros pasos de la vía. SHIP es una proteína de alrededor de 145 kDa con actividad fosfatasa, que elimina el grupo fosfato de la posición 5' del IP3, evitando la señalización de la vía de PI3K/AKT y, por lo tanto, la activación del factor de transcripción NFκB. Por otro lado, IRAK-M es una cinasa inactiva de alrededor de 68 kDa, que puede formar heterodímeros con IRAK-1 o IRAK-2 y, por lo tanto, inhibir la fosforilación de la primera, evitando así el paso de la señal para la activación del factor de transcripción NFκB (Hubbard & Moore, 2010).

En el panel **A** de la **Figura 19** se muestra la expresión de SHIP e IRAK-M en el grupo control, de células estimuladas con LPS a distintos tiempos. Se observa que a partir de 2 h de estimulación con 500 ng/ml de LPS, hay un incremento en la expresión de SHIP e IRAK-M, alcanzando un máximo entre las 8 y 18 h. Por otro lado, en el panel **C**, se observa que la estimulación de las BMMCs con 10 nM de 2-AG, también aumenta la expresión de los dos marcadores de tolerancia. Sin embargo, el tiempo en el que se induce este aumento es a partir de las 4 h de incubación con el eCN y el efecto que tiene sobre la expresión de IRAK-M no es tan significativo como el inducido con LPS. En la misma figura se muestran las cuantificaciones de la densitometría de la expresión de SHIP (panel **B**) e IRAK-M (panel **D**).

Con la finalidad de corroborar que la inducción de los marcadores de tolerancia por el 2-AG es un efecto que no depende de la expresión del receptor TLR4, se utilizaron BMMCs provenientes de ratones TLR4^{-/-}. Las células se incubaron a distintos tiempos con 10 nM

de 2-AG y se midió la expresión de SHIP. Como se observa en la **Figura 19**, el 2-AG induce un incremento en la expresión de SHIP que es estadísticamente significativo a las 4 y 8 h (panel **E** y panel **F**).

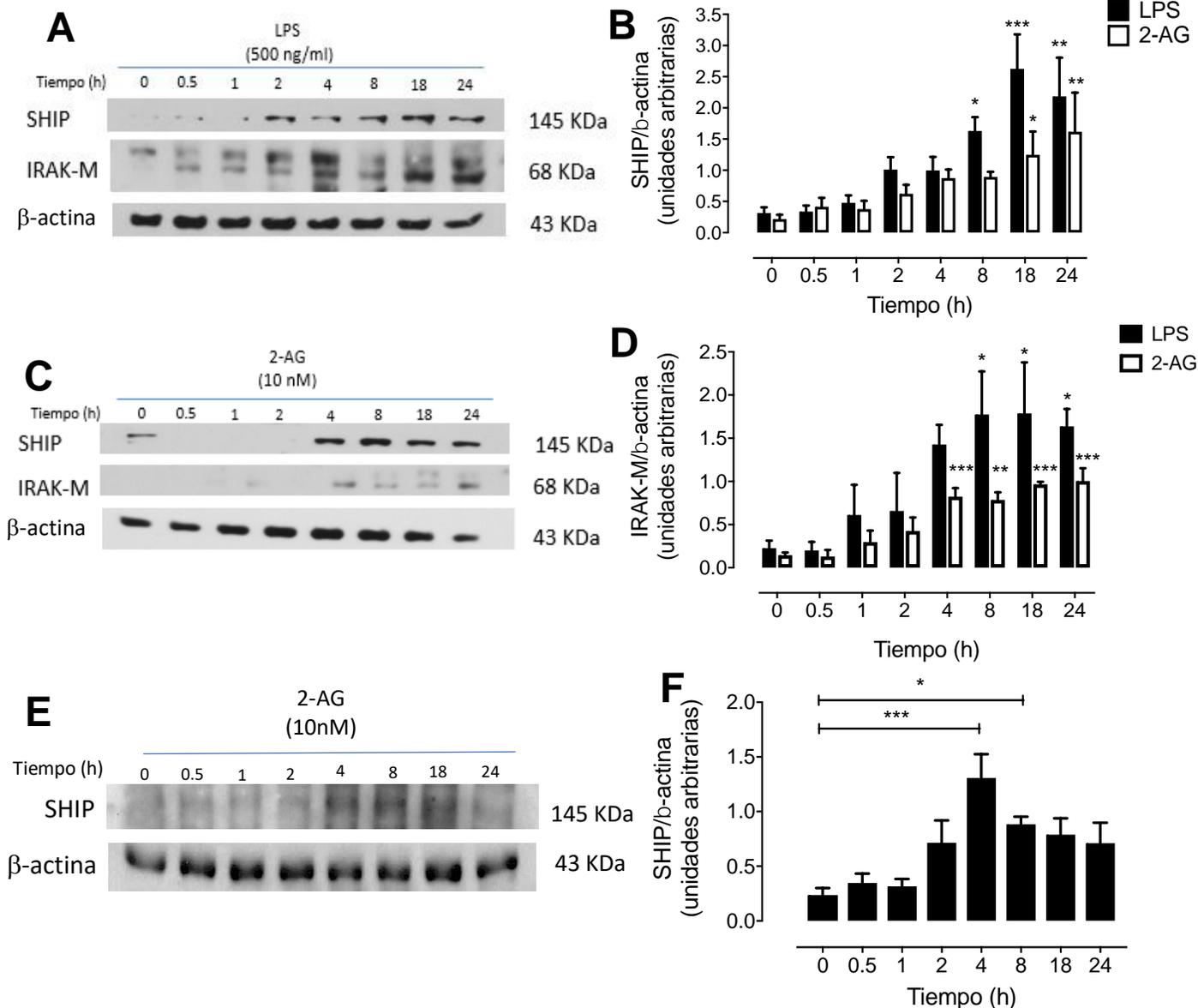


Figura 19. El 2-AG induce la expresión de marcadores de tolerancia en BMMCs. **A.** Análisis de la expresión de SHIP e IRAK-M en respuesta a la estimulación de 500 ng/ml de LPS. Se muestra la imagen representativa de 4 experimentos independientes **C.** Análisis de la expresión de marcadores de tolerancia mediante Western Blot en células WT tratadas con 10 nM de 2-AG a los tiempos indicados en la parte superior de los blots. Se muestra la imagen representativa de 4 experimentos independientes. Cuantificación de la expresión de SHIP (**B**; ANOVA de una vía seguida de Dunnet; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 4$) e IRAK-M (**D**; ANOVA de una vía seguida de Dunnet; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n = 4$) inducida por LPS y 2-AG. **E** y **F.** Western-Blot y cuantificación de la expresión de SHIP inducida por 2-AG en BMMCs $TLR4^{-/-}$ (ANOVA de una vía seguida de Dunnet; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n = 5$).

7.8 La inhibición en la secreción de TNF α a tiempos cortos por 2-AG no depende de la expresión de SHIP

Debido a que el 2-AG inhibe la secreción de TNF α a las 2 h, pero la expresión de SHIP fue detectable y estadísticamente significativa hasta las 4 h después de la incubación con el eCN, se analizó si la inhibición en la secreción del mediador inflamatorio dependía directamente de la expresión del marcador de tolerancia o estaba relacionado únicamente con los eventos tempranos en la inhibición de la fosforilación mostrada en la **Figura 18**. Para ello, se analizó el efecto del 2-AG en la secreción de TNF α en presencia de dos inhibidores: wortmanina, que inhibe la vía de la PI3K/AKT (requerida para la correcta señalización del receptor TLR4) y 3-AC, que inhibe directamente a SHIP.

En el panel **A** de la **Figura 20** se muestra que la wortmanina, por sí sola, es capaz de inhibir la secreción de TNF α inducida por LPS, lo que corrobora su importancia en la vía de señalización del TLR4. Sin embargo, no tiene ningún efecto sobre la tolerancia inducida ni por el LPS, ni por el 2-AG. Lo anterior sugiere que este fenómeno puede ser independiente de la fosfatasa SHIP.

Debido a que el uso de la wortmanina como herramienta farmacológica para demostrar que la tolerancia inducida por 2-AG es independiente de SHIP no es directa, se analizó el efecto de un inhibidor de SHIP (3-AC) sobre la tolerancia inducida por el eCN. En el panel **B** de la **Figura 20**, se observa que un tratamiento con 3-AC es capaz de inducir una mayor liberación de TNF α en respuesta a un estímulo con LPS, lo cual no había sido descrito anteriormente y demuestra que SHIP es un regulador negativo de la vía del TLR4. Para saber si la tolerancia inducida por LPS y por 2-AG a tiempos cortos depende de la expresión de SHIP, las células fueron pre-tratadas con el inhibidor y se estimularon con LPS o 2-AG por 2 h. La gráfica demuestra que el 3-AC no tiene ningún efecto sobre la tolerancia inducida por los dos estímulos mencionados anteriormente. Este resultado permite concluir que la inhibición en la secreción de TNF α inducida por LPS o 2-AG, a tiempos cortos, es independiente de la expresión y actividad de la fosfatasa y depende

de otros eventos que suceden a tiempos más cortos, como la inhibición de la fosforilación de IKK y NFκB demostrada en este estudio.

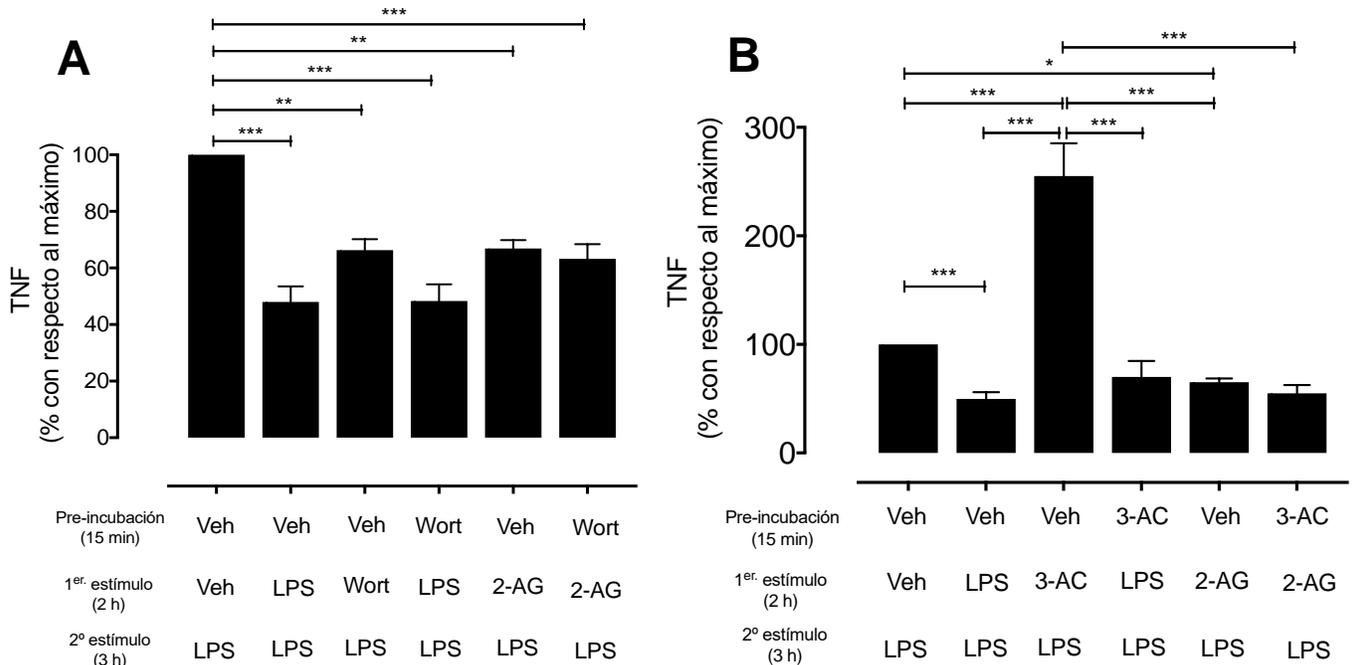


Figura 20. La inhibición de SHIP no modifica la tolerancia inducida por 2-AG a tiempos cortos. A.

Análisis del efecto de la wortmanina (3 nM) sobre la secreción de TNFα inducida por los estímulos mostrados en la gráfica. Se muestra el resultado de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía seguida de Tukey; **p<0.01, ***p<0.001. **B.** Efecto de 10 μM del 3-AC sobre la secreción de TNFα inducida por los estímulos mostrados en la figura. Cada barra muestra la media ± SEM de, al menos, 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía seguida de Tukey; *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001.

7.9 Los receptores CB₂ se encuentran localizados en regiones intracelulares en las BMMCs

Los resultados mostrados anteriormente demuestran que el 2-AG participa en el fenómeno de TE y que su efecto depende del receptor CB₂. Para poder analizar el comportamiento de este receptor en las BMMCs, se estudió la localización del mismo en nuestro modelo celular. La membrana plasmática de las células se marcó con aglutinina de germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés); para marcar los núcleos se utilizó DAPI y el receptor CB₂ se marcó con un anticuerpo específico. En la **Figura 21** se observa que el receptor se encuentra en el citoplasma de la célula y, en algunos casos,

en zonas muy cercanas al núcleo (región perinuclear); sin embargo, no se detecta ninguna señal del CB₂ en la membrana celular.

Para conocer si la distribución del receptor CB₂ cambiaba en respuesta al tratamiento con LPS una vez establecida la tolerancia, se analizó la localización de este receptor cannabinoide en células tratadas con 500 ng/ml de LPS por 4 h. Como se observa en el panel inferior de la **Figura 21**, el tratamiento con la endotoxina no cambia la localización citoplasmática del receptor CB₂ en BMMCs.

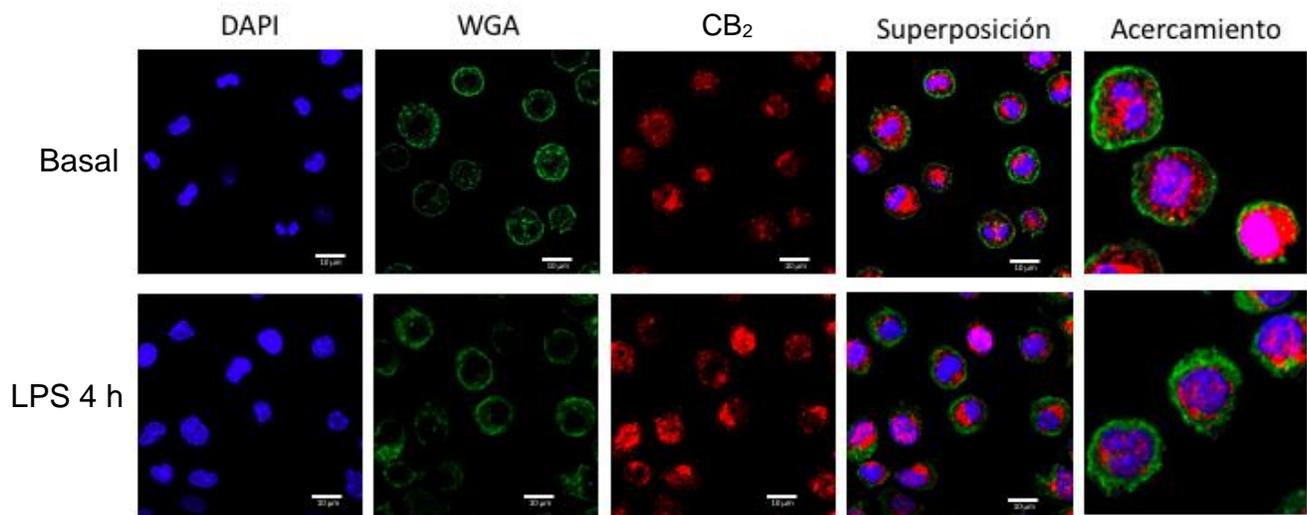


Figura 21. Los receptores CB₂ se localizan en regiones intracelulares en BMMCs. Las BMMCs se incubaron con vehículo o 500 ng/ml de LPS por 4 h. Posteriormente, las células se fijaron y se trataron con diferentes anticuerpos para inmunofluorescencia. Las imágenes obtenidas en microscopio confocal muestran a la membrana (WGA acoplada a Alexa488, verde), al receptor CB₂ (rojo) y a los núcleos celulares que se tiñeron con DAPI (azul). Barra de calibración: 10 µm.

7.10 La localización intracelular del receptor CB₂ no cambia con la adición de dinasore

Con la finalidad de identificar si la localización intracelular del receptor CB₂ se debe a una endocitosis constitutiva, se utilizó dinasore para inhibir este proceso. En la **Figura 22** se muestra que la incubación de BMMCs con dinasore no modifica la localización intracelular del receptor CB₂, lo que indica que la localización primordial de este receptor es en el citoplasma de las BMMCs y que dicha localización no se debe a una endocitosis constitutiva.

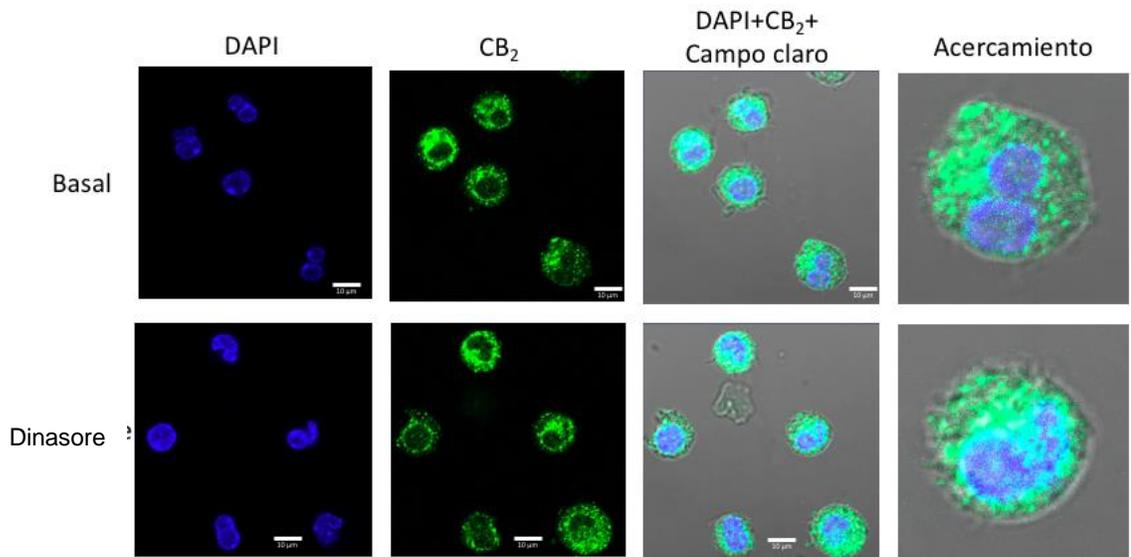


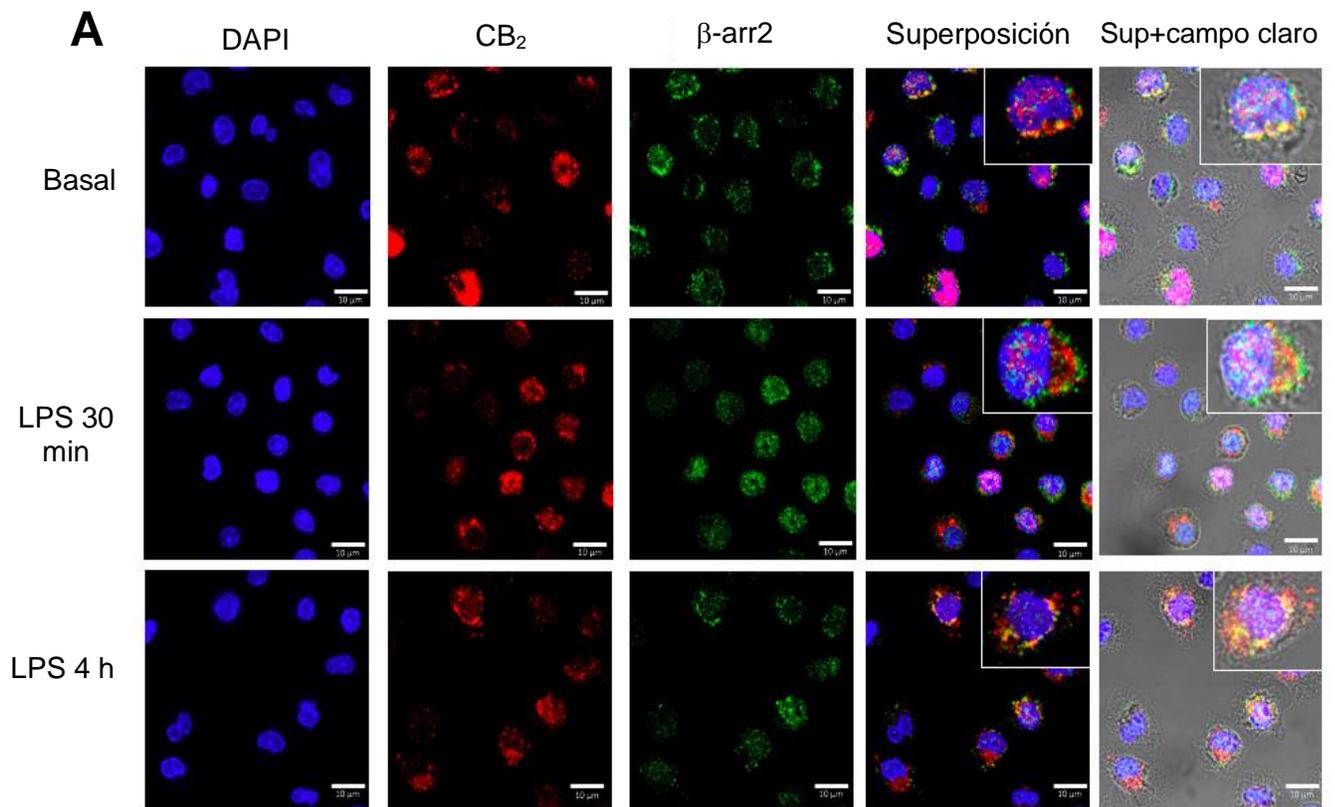
Figura 22. El dinasore no modifica la localización intracelular del receptor CB₂ en BMMCs. Las BMMCs se incubaron con vehículo o dinasore (80 μ M) por 30 min. Posteriormente, las células se fijaron y se trataron con diferentes anticuerpos para inmunofluorescencia. Las imágenes obtenidas en microscopio confocal que muestran al receptor CB₂ (verde) y a los núcleos celulares que se tiñeron con DAPI (azul). Barra de calibración: 10 μ m.

7.11 La estimulación de BMMCs con LPS induce el tráfico vesicular del receptor CB₂

Como prueba indirecta de que la estimulación de las BMMCs con LPS induce la secreción de 2-AG, y que éste actúa de forma autocrina, se analizó la distribución y tráfico vesicular del receptor CB₂ en respuesta a la estimulación con 500 ng/ml de la endotoxina. Se analizó la co-localización del receptor CB₂ con varios marcadores moleculares que son importantes para el tráfico vesicular de distintos GPCRs.

Se utilizaron distintos tiempos de tratamiento con LPS; los tiempos cortos de estimulación se estudiaron con la finalidad de detectar cambios rápidos en el tráfico vesicular del receptor CB₂ en respuesta a la producción rápida de 2-AG, mientras que el análisis a tiempos largos se llevó a cabo para estudiar si había cambios en la localización del receptor CB₂ cuando la tolerancia al LPS ya estaba establecida. Inicialmente, se analizó la co-localización del receptor CB₂ con la β -arr2 y con el marcador de endosomas tempranos, EEA-1 (**Figura 23**), ya que la interacción de un GPCR con estas moléculas

es uno de los primeros eventos que ocurren después de la activación con un ligando para iniciar el tráfico vesicular de los receptores GPCRs. Como se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, los receptores CB₂ co-localizan parcialmente con β -arr2 ($\approx 20\%$, panel **A**) y no co-localizan con EEA-1 ($\approx 5\%$, panel **B**) en condiciones basales, y la interacción con estas proteínas no cambia después del tratamiento con LPS, ni a tiempos cortos de estimulación con LPS (30 min), ni al tiempo en el que ya está establecida la tolerancia en BMMCs (4 h) (Para β -arr2 $F=0.757$, $p>0.05$; para EEA-1 $F=0.4156$, $p>0.05$. ANOVA de una vía).



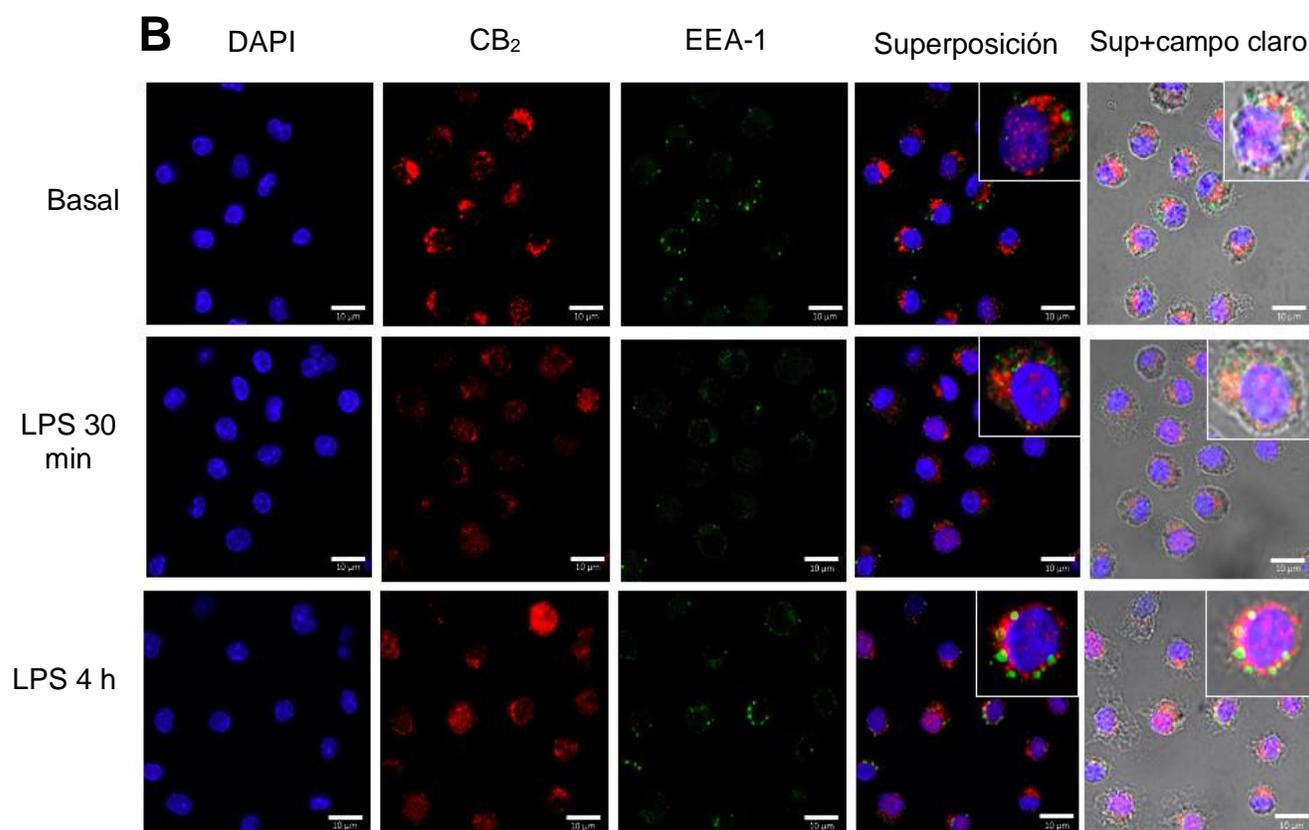


Figura 23. El LPS no modifica la co-localización del receptor CB₂ con β -arr2 y con EEA-1. Las BMMCs se incubaron con vehículo o 500 ng/ml de LPS por 30 min o 4 h. Posteriormente, las células se fijaron y se trataron con diferentes anticuerpos para inmunofluorescencia. **A.** Imágenes obtenidas en microscopio confocal que muestran al receptor CB₂ (rojo) y β -arr2 (verde). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). **B.** Imágenes del microscopio confocal que muestran al receptor CB₂ (rojo) y EEA-1 (verde). Barra de calibración: 10 μ m. Ambos paneles muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

Para analizar si la activación del receptor TLR4 podía inducir el reciclamiento del receptor CB₂, se analizó la co-localización del receptor a endocannabinoides con Rab11 que es un marcador de endosomas de reciclamiento lento y que se ha descrito en otros modelos celulares que es la vía principal de reciclamiento para los receptores CB₂ (Grimsey et al. 2011). Como se muestra en la **Figura 24 (A y B)**, en condiciones basales sólo una cantidad pequeña del receptor, alrededor del 9%, está localizada en vesículas positivas para Rab11 y esta proporción incrementa un 40% después del tratamiento por 4 h con LPS. Este resultado indica que sólo algunos receptores CB₂ se reciclan hacia la membrana plasmática o hacia otros compartimentos endosomales mediante la vía de Rab11 después de la estimulación con la endotoxina.

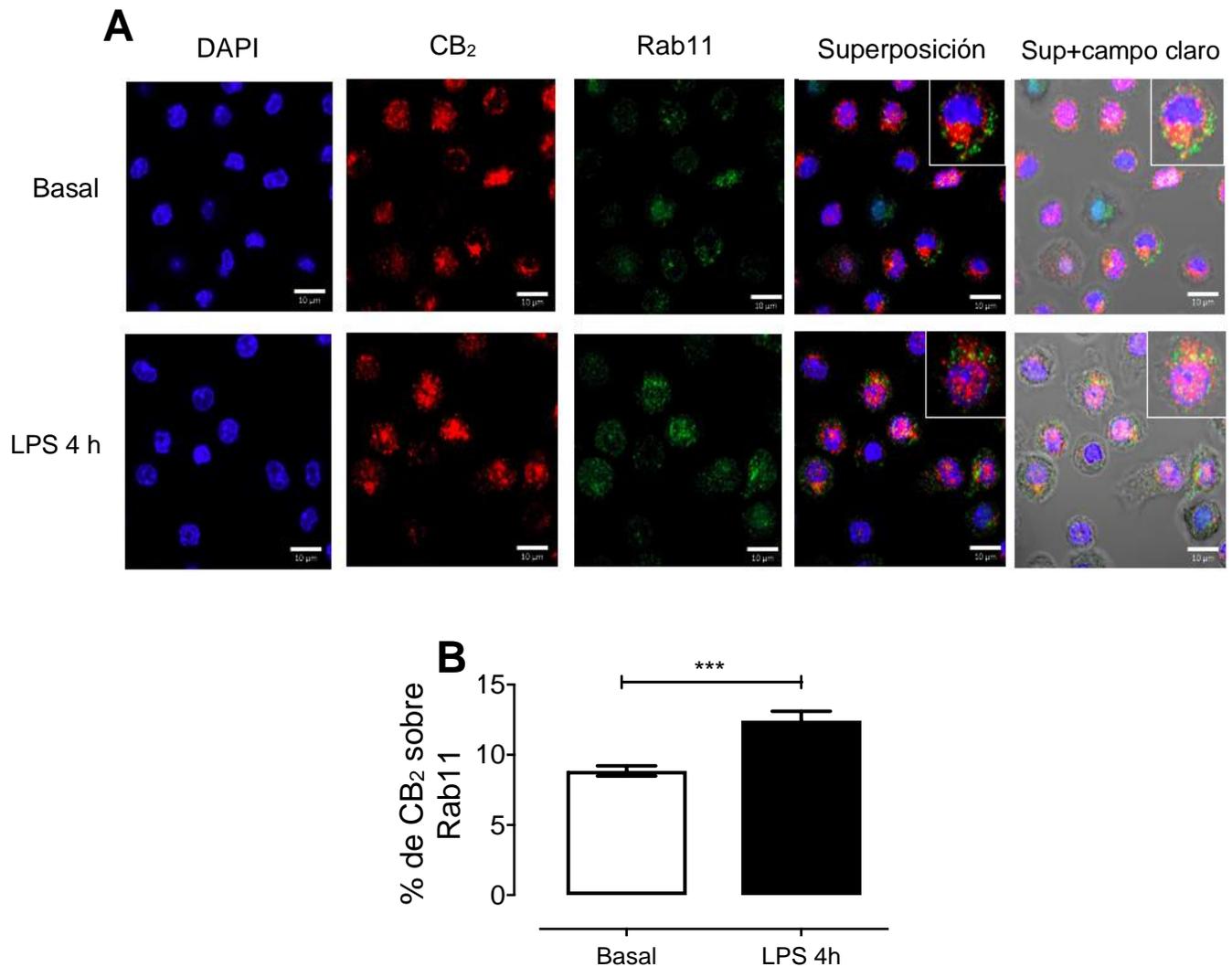
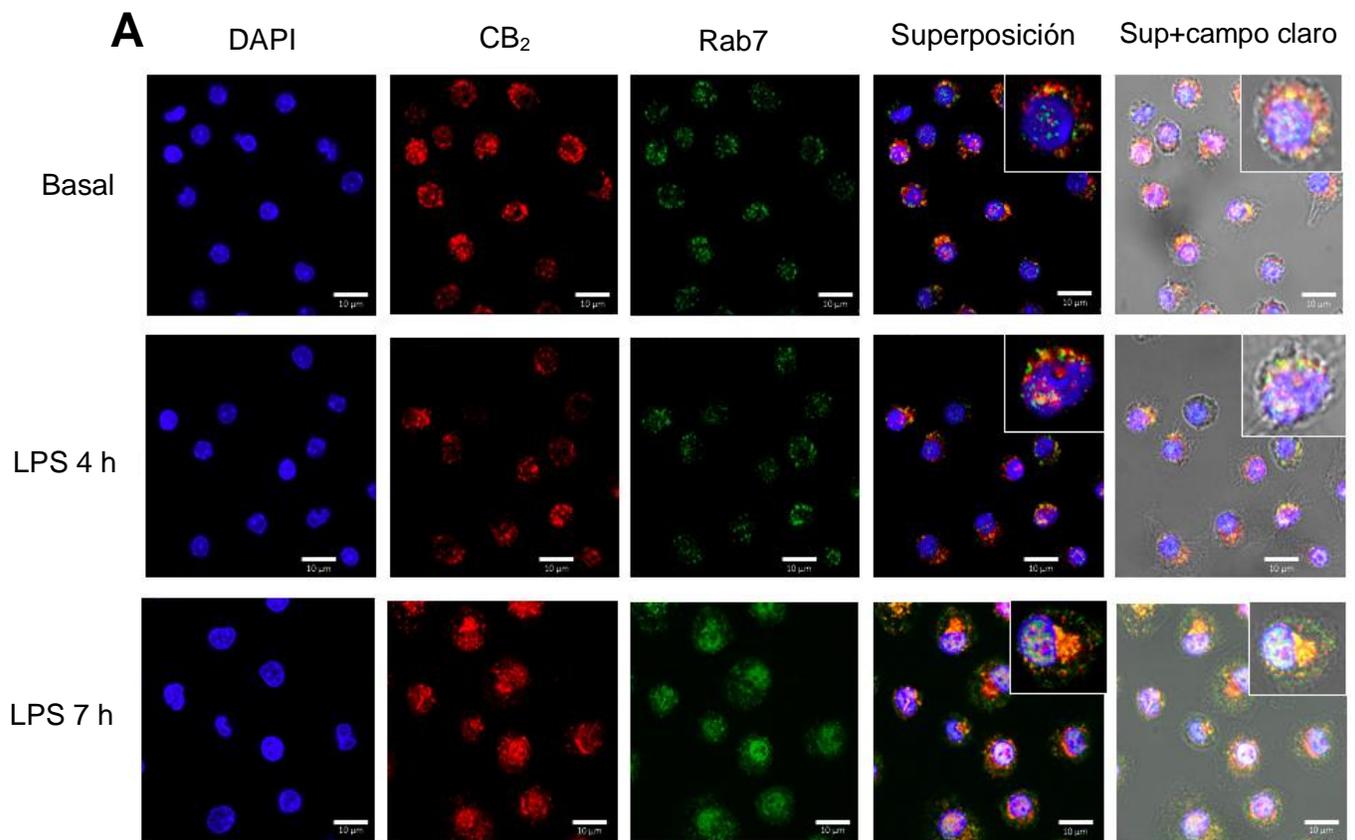


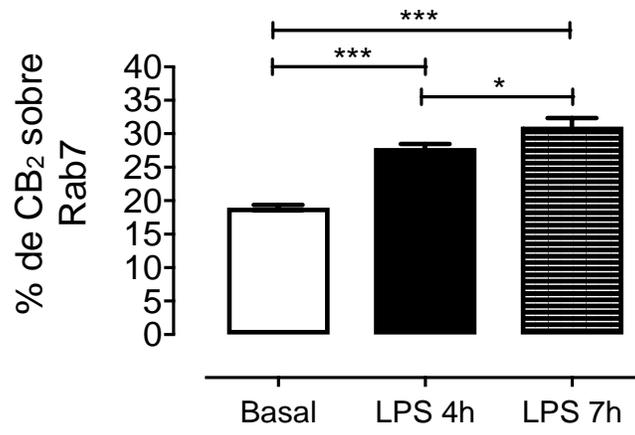
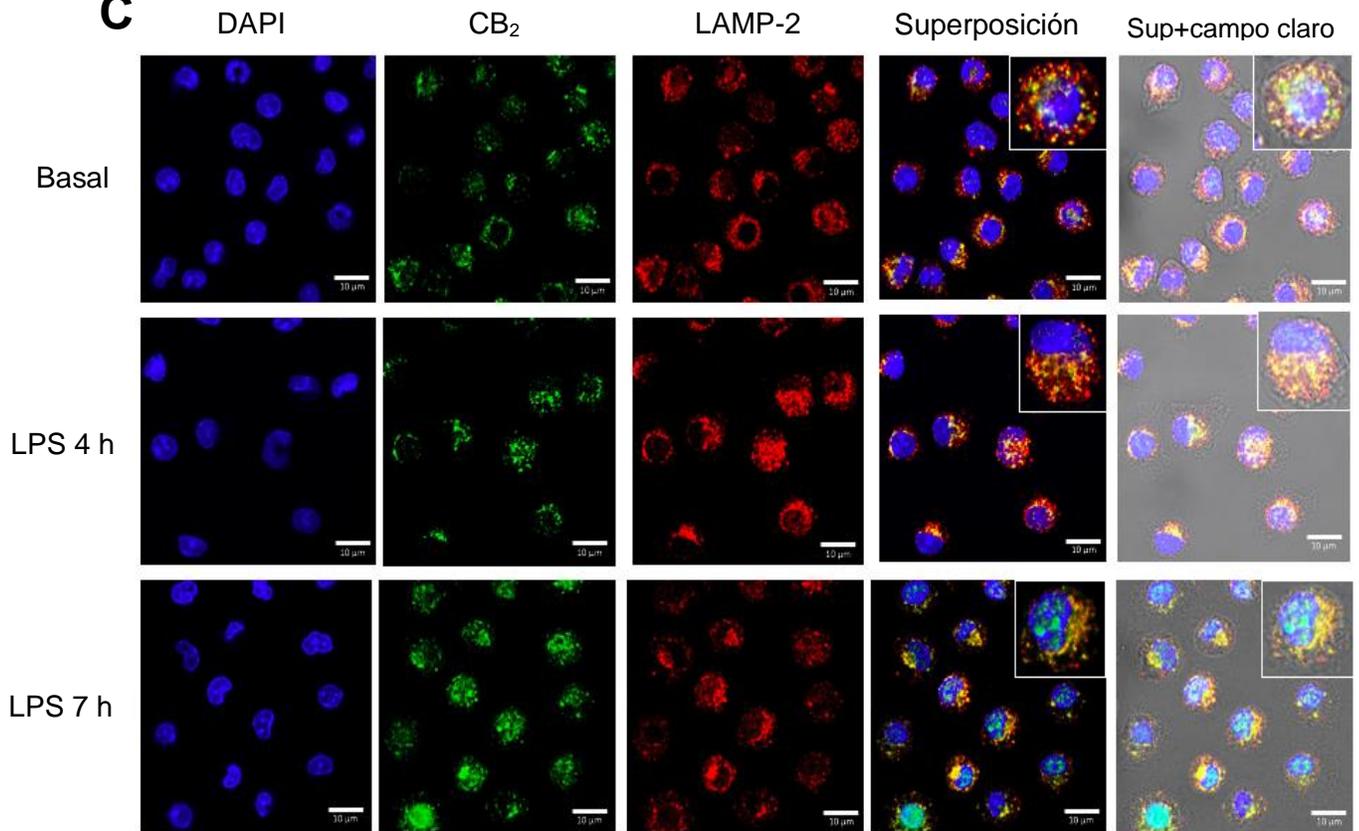
Figura 24. El LPS incrementa la co-localización del receptor CB₂ con Rab11 en BMMCs. Las BMMCs se incubaron con vehículo o 500 ng/ml de LPS por 4 h. Posteriormente, las células se fijaron y se trataron con diferentes anticuerpos para inmunofluorescencia. **A.** Imágenes obtenidas en microscopio confocal que muestran al receptor CB₂ (rojo) y Rab11 (verde). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). Barra de calibración: 10 μm. **B.** Cuantificación de la co-localización de CB₂ y Rab11 utilizando el coeficiente de Mander. La gráfica muestra las medias ± EE de 30 células (n=3). t de Student no pareada (***)p<0.001).

Otra de las vías de tráfico vesicular que pueden seguir los GPCRs, es la vía de degradación. Para estudiar si el tratamiento con LPS inducía el tráfico de receptores CB₂ hacia esta vía, se analizó la co-localización de estos receptores con las proteínas Rab7 (marcador de endosomas tardíos) y LAMP-2 (marcador de lisosomas). Para esto, se utilizaron tiempos más largos de estimulación con LPS (4 y 7 h), ya que es posible que el receptor CB₂ requiera más tiempo para alcanzar estos compartimentos vesiculares.

Como se observa en los paneles **A** y **B** de la **Figura 25**, en condiciones basales, alrededor de un 19% del receptor CB₂ está localizado en vesículas positivas para Rab7, mientras que la estimulación con LPS induce un incremento significativo de la co-localización de estas dos proteínas con valores de 28% y 32%, respectivamente.

Con respecto a la localización del receptor CB₂ en lisosomas, se puede observar en los paneles **C** y **D** de la **Figura 25** que el tratamiento por 4 h con LPS no induce un cambio en la co-localización del receptor CB₂ y LAMP-2 (20.4%) con respecto a las células en condiciones basales (22.6%); sin embargo, el tratamiento por 7 h con la endotoxina, sí incrementa de forma estadísticamente significativa la co-localización de CB₂ y LAMP-2 (33.4%), mostrando así que una proporción de receptores CB₂ son degradados en BMMCs estimuladas por tiempos largos con LPS.



B**C**

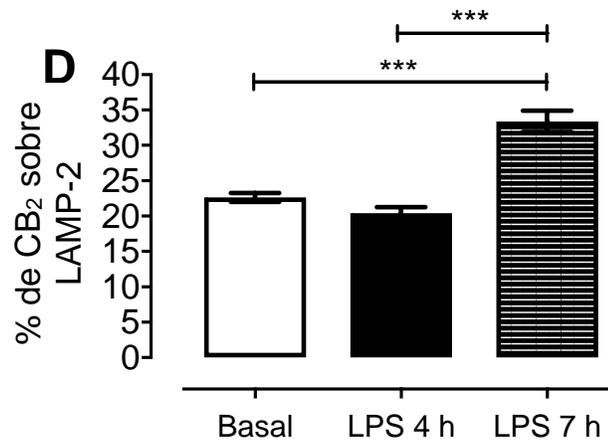


Figura 25. La estimulación de BMMCs con LPS incrementa la co-localización del receptor CB₂ con Rab7 y con LAMP-2. Las BMMCs se incubaron con vehículo o 500 ng/ml de LPS por 4 o 7 h. Posteriormente, las células se fijaron y se trataron con diferentes anticuerpos para inmunofluorescencia. **A.** Imágenes obtenidas en microscopio confocal que muestran al receptor CB₂ (rojo) y Rab7 (verde). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). **B.** Cuantificación de la co-localización de CB₂ y Rab7 utilizando el coeficiente de Mander. **C.** Imágenes del microscopio confocal que muestran al receptor CB₂ (verde) y LAMP-2 (rojo). **D.** Gráfica que muestra la cuantificación de la co-localización de CB₂ y LAMP-2 utilizando el coeficiente de Mander. Barra de calibración: 10 μ m. Las gráficas muestran las medias \pm EE de 30 células (n=3). ANOVA de una vía seguida de Tukey. *p<0.05, ***p<0.001.

7.12 El 2-AG inhibe la secreción de TNF α inducida por LPS *in vivo*.

Para estudiar el efecto del 2-AG *in vivo*, se midió la secreción de TNF α inducida por LPS en la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6J. Para poder aislar la respuesta dependiente de CC, se analizó la secreción de TNF α después de 1 h de estimulación con la endotoxina, ya que se sabe que el TNF α de la cavidad peritoneal medido a este tiempo, no proviene de ningún otro tipo celular (Supajatura et al. 2001; Madera-Salcedo et al. 2013). En el panel **A** de la **Figura 26** se muestra que únicamente la dosis de 1 mg/kg de 2-AG, inhibe la secreción de TNF α inducida por LPS y esta inhibición se encuentra alrededor del 50%, mientras que dosis más pequeñas de este eCN, no logran inhibir la secreción del mediador inflamatorio. Para corroborar que el efecto observado es dependiente de CC, se utilizaron ratones *Kit^{Wsh/Wsh}*. Como se observa en el panel **B** de la **Figura 26** los ratones *Kit^{Wsh/Wsh}* no secretan TNF α 1 h después de la administración de LPS y, por lo tanto, la administración de 2-AG no tuvo ningún efecto. Por otro lado, en los ratones que fueron reconstituidos con BMMCs (*Kit^{Wsh/Wsh} rec*) se volvió a observar la secreción de TNF α en respuesta al LPS, que está alrededor de 450 pg/ml y, de igual

manera, se recuperó el efecto inhibitor inducido por 1 mg/kg de 2-AG que causó un 60% de inhibición.

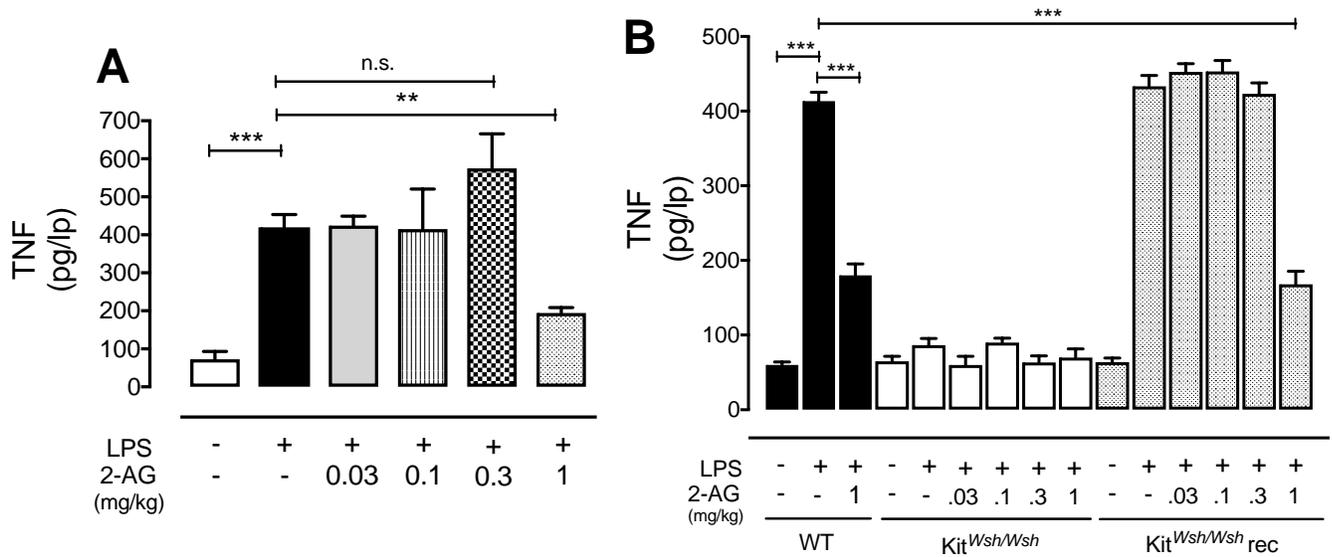


Figura 26. El 2-AG inhibe la producción de TNF α inducida por LPS *in vivo*. **A.** Efecto del 2-AG en la secreción de TNF α inducida por 1 mg/kg de LPS en la cavidad peritoneal de ratones C57BL6/J. **B.** Comparación del efecto del 2-AG sobre la secreción de TNF α inducida por LPS en ratones wild type (WT), ratones deficientes de CC (*Kit^{Wsh/Wsh}*) y ratones deficientes de CC reconstituidos con BMMCs provenientes de ratones WT. ANOVA de una vía seguida de Dunnett (**p<0.01, ***p<0.001, n \geq 4)

8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los principales hallazgos de este trabajo fueron los siguientes: a) El eCN 2-AG produce tolerancia a la endotoxina en BMMCs de forma similar a como lo hace el propio LPS; b) Los dos receptores a cannabinoides descritos, el CB₁ y el CB₂, se expresan y son funcionales en nuestro modelo celular. Sin embargo, únicamente el receptor CB₂ está involucrado en los efectos del 2-AG que inducen tolerancia al LPS; c) La activación del receptor TLR4 induce la producción de 2-AG; d) Los efectos del 2-AG sobre la vía de señalización del TLR4 incluyen la inhibición de la fosforilación de la cinasa IKK y de p65, que son fundamentales para la transducción de la señal, así como la inducción de los marcadores de tolerancia SHIP e IRAK-M; e) El bloqueo de la secreción temprana de TNF α que se presenta en la tolerancia a la endotoxina no parece estar relacionado con la actividad de SHIP; f) La activación del receptor TLR4 en CC induce el tráfico intracelular del receptor CB₂. Éste se encuentra en vesículas positivas para Rab11 (que

indican reciclamiento lento), para Rab7 y para LAMP-2 (que son marcadores de endosomas tardíos y de lisosomas, respectivamente) lo que sugiere que una fracción del receptor se recicla a la membrana plasmática y otra se degrada; y g) El 2-AG previene la secreción de TNF α , proveniente de CC, inducida por LPS *in vivo*, en un modelo murino de endotoxemia.

Uno de los principales resultados que se obtuvieron en este trabajo, y que no había sido reportado previamente, es que el 2-AG es capaz de inducir tolerancia al LPS en BMMCs, de forma similar a como lo hace la propia endotoxina. Esto se encontró mediante la medición de la secreción de TNF α , cuya disminución es considerada una característica universal de la TE (West & Heagy 2002). Si bien existen distintos estudios que han mostrado que los eCN, 2-AG y AEA, tienen acciones anti-inflamatorias y que inhiben las respuestas secretoras inducidas por la activación del TLR4, estos efectos se han demostrado únicamente de forma aguda, es decir, cuando el TLR4 no ha sido estimulado de forma crónica y, por lo tanto, no hay desarrollo de tolerancia (Facchinetti et al. 2003; Gallily et al. 2000; Krishnan & Chatterjee 2012; Loubopoulos et al. 2011; Lu et al. 2014; Panikashvili et al. 2006). Los efectos inhibidores de los eCN sobre la vía de señalización del receptor TLR4 han sido reportados en diversos tipos de células del sistema inmune, como los macrófagos, mas no en CC. Estos efectos incluyen la reducción de la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF α , así como la inhibición de enzimas que producen mediadores inflamatorios lipídicos, como la COX2 (Gallily et al. 2000; Chang et al. 2001).

Con respecto a los mecanismos moleculares de inhibición observados en nuestros resultados, la incubación prolongada de las BMMCs con 2-AG inhibe la fosforilación de IKK y de p65 inducida por LPS. El bloqueo de la fosforilación de estas proteínas por cannabinoides, es un efecto que ya ha sido reportado por otros autores en distintas células del sistema inmune como los macrófagos (Jeon et al. 1996) y la microglía (More et al. 2013); sin embargo, los mecanismos mediante los cuales ocurre no han sido descritos completamente. Como se mencionó en la introducción, los receptores CB₂ activan a las proteínas G_{Vo} heterotriméricas que, al ser estimuladas, se disocian en dos

partes, la subunidad α y las subunidades $\beta\gamma$. Por un lado, la subunidad α inhibe a la AC, mientras que el dímero $\beta\gamma$ activa las vías de las MAPK y de la PI3K (Rubovitch et al. 2004; Bouaboula et al. 1995; Rozengurt 2007). En monocitos y macrófagos se ha demostrado que la activación de la vía de la PI3K inhibe la fosforilación de IKK sin afectar la de ERK inducida por LPS (Guha & Mackman 2002), lo cual coincide con los resultados mostrados en este estudio, por lo que un mecanismo similar pudiera explicar las acciones de 2-AG en la vía de señalización del receptor TLR4 en BMMCs.

La tolerancia al LPS también está controlada por la expresión de diferentes reguladores negativos de la vía de señalización del receptor TLR4 (Biswas & Lopez-Collazo 2009). Entre éstos se encuentran la fosfatasa SHIP y la cinasa inactiva IRAK-M, las cuales incrementan después de la incubación prolongada con LPS, tanto en monocitos como en CC (Sly et al. 2004; Biswas & Lopez-Collazo 2009). Nuestros datos muestran que estos dos marcadores de tolerancia se detectaron después de 4 h de estimulación con el 2-AG, lo cual sugiere que se requiere la activación de la transcripción génica para sintetizarlos *de novo*. Nuestro trabajo es el primero en demostrar que estos dos marcadores de tolerancia pueden ser inducidos en respuesta a la exposición prolongada a eCN en BMMCs y que su expresión ocurre de manera similar a como la induce el LPS lo que establece un nuevo mecanismo de acción del 2-AG para el control de las respuestas inflamatorias.

Como lo muestran los resultados, la ventana de tiempo en la que el 2-AG induce la expresión de los marcadores de TE no coincide con la de la inhibición en la secreción de $\text{TNF}\alpha$ producida por el mismo eCN. Este resultado sugiere la posibilidad de que no exista una relación directa entre la inducción de IRAK-M y SHIP y la disminución temprana en la secreción del mediador inflamatorio $\text{TNF}\alpha$. Debido a esta falta de coincidencia temporal, se analizó el efecto de la inhibición farmacológica de SHIP sobre el desarrollo de tolerancia inducido por 2-AG. La inhibición de la fosfatasa no modificó su desarrollo y, de manera sorprendente, tampoco modificó la inducción de tolerancia temprana (2 h) por la endotoxina. Esto último es un hallazgo novedoso, ya que siempre se ha considerado que la inducción de TE requería, necesariamente, de la expresión de SHIP

(Sly et al. 2004). Lo anterior indica que los eventos tempranos de TE inducidos por el 2-AG incluyen el bloqueo de la fosforilación de IKK y NF κ B, mientras que en la TE inducida por LPS, además del bloqueo de estas dos proteínas, se presenta también un bloqueo en la fosforilación de MAPKs. Finalmente, en ninguno de los dos casos parece haber una relación directa entre el desarrollo de TE con la inducción de SHIP.

Además del bloqueo en la fosforilación de IKK y NF κ B inducidas por el 2-AG, existen otros mecanismos de inhibición tempranos que podrían activarse por la estimulación de receptores a cannabinoides. Por ejemplo, se sabe que la activación de algunos GPCRs, como los receptores a opioides, puede inducir fenómenos tempranos que inhiben la vía del receptor TLR4, como la asociación de β -arr con TRAF6 (Madera-Salcedo et al. 2013). De igual manera, en macrófagos, se ha encontrado que algunos reguladores negativos del TLR4 como SOCS1, pueden expresarse a tiempos tempranos, incluso antes de que se observen cambios significativos en la expresión de otros marcadores de tolerancia (Sly et al. 2004). La inducción de la expresión de SHIP e IRAK-M a tiempos largos por el 2-AG podría contribuir a modular los efectos tardíos asociados a la TE.

Otro hallazgo novedoso de este trabajo es que la estimulación del receptor TLR4 con LPS en CC induce la producción de 2-AG. Aunque existen algunos reportes que demuestran que distintas células del sistema inmune pueden producir 2-AG (Berdyshev et al. 2001; Chiurchiu et al. 2015), la relación de la producción de este eCN con la activación del receptor TLR4 se limita a unos cuantos estudios. Específicamente, se ha descrito que los niveles de 2-AG incrementan después de la estimulación de plaquetas de rata (Varga et al. 1998) y de macrófagos circulantes (Di Marzo et al. 1999) con concentraciones de LPS (200 μ g/ml) mayores a las utilizadas en este proyecto (500 ng/ml). Además, comprobamos que la producción de 2-AG inducida por LPS en CC es un efecto que depende de la presencia del receptor TLR4 debido a que en células derivadas de ratones TLR4^{-/-} no se pudo detectar ningún incremento en la producción de este eCN.

El hallazgo de que las CC pueden producir 2-AG en respuesta a la estimulación con LPS y que éste participa en el desarrollo de TE, contribuye a la idea que sostienen diversos autores de que los eCN pueden funcionar como reguladores homeostáticos del sistema inmune, cuya función es mantener el balance entre la inflamación y la tolerancia (Chiurchiu et al. 2015; Chiurchiù 2016; Acharya et al. 2017).

El mecanismo mediante el cual la activación del receptor TLR4 puede inducir la síntesis del 2-AG no se ha descrito; sin embargo, se ha demostrado que la señalización del TLR4 puede activar a la fosfolipasa C (PLC) (Thi et al. 2014) que puede incrementar la producción de diacilglicerol (DAG), el cual funciona como sustrato de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL) para la formación de 2-AG. Aunque la DAGL se encuentra ampliamente expresada en distintas células del sistema inmune (Chiurchiu et al. 2015) y se conocen sus funciones principales, los mecanismos de regulación de esta enzima no han sido completamente dilucidados. Sin embargo, su análisis estructural ha permitido sugerir distintas vías de señalización que pueden llevar a su activación. La DAGL presenta varios sitios potenciales para su fosforilación por distintas cinasas de proteína como la PKC, PKA, Src y CAMKII (Reisenberg et al. 2012). De forma particular, se ha observado que la actividad de la DAGL incrementa en respuesta a la fosforilación de PKA (Roque et al. 1998; Rosenberger et al. 2007) y, debido a que la estimulación del TLR4 incrementa la producción de cAMP y la consecuente activación de la PKA (Song et al. 2007), es posible pensar que la síntesis del 2-AG en respuesta al LPS dependa de la activación de esta cinasa en BMMCs.

Por otro lado, en estudios realizados en macrófagos se ha demostrado que el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) también induce el aumento en la actividad de la DAGL, provocando la acumulación de niveles elevados de 2-AG, de forma dependiente de la NADPH oxidasa (NOX) (Matthews et al. 2016). Debido a que la estimulación del receptor TLR4 lleva a la activación de la NOX y por lo tanto a la producción de ROS (Singh et al. 2016), esta es otra vía que podría participar en la activación de la DAGL y, por lo tanto, en la producción de 2-AG inducida por LPS en nuestro modelo celular.

El 2-AG puede ejercer sus efectos a través de la activación de diferentes receptores, dentro de los que se encuentran canales de sodio, receptores de glicina, canales como el TRPA1 y el TRPV1 y receptores PPARs, entre otros (Chiurchiù 2016); sin embargo, estos efectos se han descrito para concentraciones en el rango micromolar (μM), por lo que observar la inducción de TE con concentraciones pequeñas del 2-AG (10 nM) fue el primer indicio de que este efecto dependía de la activación de los receptores a cannabinoides.

Con respecto a lo anterior, se encontró que la TE inducida por 2-AG depende de la activación del receptor CB_2 , sin la participación del receptor CB_1 . A pesar de que los resultados del presente trabajo demuestran que ambos receptores están expresados en las BMMCs y son funcionales, únicamente el antagonista para el receptor CB_2 , el AM630, fue capaz de prevenir el desarrollo de tolerancia inducida por 2-AG, mientras que el antagonista para el receptor CB_1 no tuvo efecto. Esto lleva a preguntarse qué papel juegan los receptores CB_1 en las CC. Al respecto, existen pocos estudios que han demostrado que la activación del receptor CB_1 está más relacionada con la inhibición de la desgranulación de este tipo celular (Small-Howard et al. 2005; Samson et al. 2003).

La expresión de los receptores a cannabinoides ha sido reportada en diferentes células del sistema inmune dentro de las que se encuentran las CC, los monocitos y macrófagos, los linfocitos B y las células NK (Pertwee & Ross 2002; Galiègue et al. 1995). Así mismo, la co-expresión de los receptores CB_1 y CB_2 fue reportada anteriormente en dos líneas diferentes de CC (RBLH3 y P815); sin embargo, este es el primer estudio en demostrar esta co-expresión en las BMMCs. Esto es importante debido a que las BMMCs, al ser cultivos primarios obtenidos directamente de ratones, mimetizan la fisiología de las células *in vivo*.

El 2-AG puede unirse con alta afinidad, tanto al receptor CB_1 como al CB_2 y se ha propuesto como ligando endógeno de ambos (Sugiura & Waku 2000). Sin embargo, el papel de este eCN en las respuestas inflamatorias depende, principalmente, de la activación del receptor CB_2 (Munro et al. 1993; Carayon et al. 1998) sobre el que actúa

como un agonista total (Gonsiorek et al. 2000). Los resultados de este trabajo concuerdan con lo reportado por otros autores que han demostrado que la modulación de la actividad del receptor TLR4 por cannabinoides depende de la activación del receptor CB₂ (Germain et al. 2002; Correa et al. 2005; Merighi et al. 2012; Gui et al. 2013; Zhao et al. 2010). Un estudio reciente demostró que el receptor GPR55, que también es blanco de eCN y puede ser activado por el 2-AG (Ryberg et al. 2007), está expresado en BMMCs (Cruz et al. 2018); sin embargo, su participación como modulador de las respuestas inducidas por la activación del TLR4 no ha sido explorada.

Otro de los hallazgos de este trabajo es que el receptor CB₂ se encuentra en compartimentos intracelulares. Debido a que esta ubicación no había sido descrita anteriormente en ningún modelo de CC, nos preguntamos si las condiciones experimentales utilizadas en este estudio podrían haber influido en la localización intracelular de los receptores CB₂. Para descartar lo anterior, determinamos la localización de estos receptores en células sin sensibilizar, es decir, sin IgE (resultados no mostrados), ya que el proceso de sensibilización de las BMMCs es un estímulo que puede inducir distintos cambios en este modelo celular (Medina-Tamayo et al. 2011; Jiménez-Andrade et al. 2013). Encontramos que los receptores CB₂ se localizan en compartimentos intracelulares aún en ausencia de la estimulación con IgE, lo que permite concluir que su localización no se afecta por las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. De igual manera, se determinó que su localización intracelular no cambia por la adición de LPS o del dinasore, que es un inhibidor de la endocitosis. Aunque este es un resultado inesperado, se ha reportado que los receptores a cannabinoides están localizados principalmente en el citoplasma en otros tipos de células del sistema inmune. Por ejemplo, en linfocitos B humanos, los receptores CB₂ pueden observarse en la membrana plasmática pero la gran mayoría se localiza en el citoplasma celular. De igual manera, en linfocitos T y monocitos, la expresión de los receptores CB₂ se encuentra restringida a localizaciones intracelulares y, en leucocitos sanguíneos periféricos, también (Castaneda et al. 2013).

Se ha demostrado que los receptores a cannabinoides que se encuentran en

compartimentos intracelulares tienen funciones distintas a los receptores de la membrana plasmática. Se sabe que los receptores CB₁ y CB₂ que se encuentran en el interior de la célula están ubicados, principalmente, en endolisosomas ácidos (Rozenfeld 2011; Zou & Kumar 2018; Brailoiu et al. 2015) y su activación por agonistas específicos contribuye al incremento de calcio proveniente del retículo endoplásmico y de los mismos lisosomas (Zou & Kumar 2018; Brailoiu et al. 2015). Además de la localización lisosomal, también se ha descrito que algunos receptores a cannabinoides pueden estar expresados en mitocondrias donde están directamente involucrados en las funciones de este organelo en la respiración celular (Zou & Kumar 2018).

Aunque la localización intracelular de los receptores CB₂ podría añadir complejidad a la farmacología de este receptor al considerar que sus ligandos tengan dificultad en acceder a ellos, es importante mencionar que los eCN se producen a demanda de forma intracelular, por lo que su primer blanco podrían ser los receptores ubicados en el mismo sitio de producción. Incluso los ligandos que se añaden de forma extracelular, por su naturaleza lipídica (como el mismo 2-AG y los antagonistas empleados en este trabajo) pueden atravesar con facilidad la membrana plasmática y activar a los receptores que se encuentren en el interior de las células.

Otro de los hallazgos importantes de este trabajo, fue el hecho de que la incubación de BMBCs con LPS induce el tráfico intracelular de los receptores CB₂. Se sabe que los GPCRs pueden moverse entre distintos compartimentos intracelulares para interactuar con diversas vías de señalización (Jean-Alphonse & Hanyaloglu 2011) y que el tráfico de estos receptores en diferentes tipos de vesículas es un proceso importante para dirigirlos a distintos destinos: i) reciclaje a la membrana plasmática; ii) señalización desde compartimentos endosomales; o iii) degradación. Como se describió anteriormente, existen diferentes moléculas que participan en el tráfico vesicular de los GPCRs. Entre ellas, unas de las más importantes y que sirven como herramienta para conocer la localización de estos receptores, son las proteínas Rab (Zerial & McBride 2001).

Nuestros resultados mostraron que no hay una interacción importante del receptor CB₂ con la βarr2. Este receptor es de la clase A, tipo rodopsina, que se caracteriza por no presentar una interacción estable con la βarr2 (Dhopeshwarkar & Mackie 2014). Este hecho podría explicar la falta de co-localización del receptor CB₂ con la βarr2 observada en este estudio.

De igual manera, nuestros resultados muestran que el receptor CB₂ tampoco co-localiza con las proteínas Rab5 y EEA-1, que son marcadores de endosomas tempranos, lo que sugiere que el receptor CB₂ no transita por la vía clásica de endocitosis de los GPCRs (mediada por clatrina) en respuesta a la activación del receptor TLR4 en BMMCs, que era lo esperado con base en la localización primordialmente intracelular de este receptor. Estos datos difieren de lo descrito por otro grupo de investigación que demuestra que, en respuesta a la estimulación de células inmortales HEK293, con un agonista del receptor CB₂, éste se endocita en vesículas positivas para Rab5 (Grimsey et al. 2011). Sin embargo, esta diferencia puede explicarse por el modelo celular empleado y por el hecho de que tanto Rab5 como el receptor CB₂ fueron sobreexpresados en las células HEK293. En líneas celulares immortalizadas, como las mencionadas anteriormente, pueden existir alteraciones tanto en la expresión, como en el tráfico vesicular de algunas proteínas lo que puede hacer que los resultados que se obtengan en estos modelos celulares varíen en comparación con los obtenidos en células de cultivos primarios como las BMMCs. De igual manera, inducir la sobreexpresión de las proteínas (por ejemplo, mediante transfecciones) puede inducir una co-localización entre proteínas que no existiría en condiciones de expresión normales. En contraste con la co-localización del CB₂ con Rab5, se pudo determinar que después de la incubación crónica con LPS, los receptores CB₂ co-localizan con la proteína Rab11. Esta proteína controla el reciclamiento lento de los GPCRs hacia la membrana plasmática y se ubica principalmente en la región perinuclear y en la red trans-Golgi (Grimsey et al. 2011; Seachrist & Ferguson 2003). Debido a que no se encontró al receptor CB₂ en la membrana plasmática, es posible pensar que el tráfico de este receptor, mediado por Rab11, puede llevarlo a otras localizaciones intracelulares desde las cuales sigue señalizando.

Además de la co-localización con Rab11, se encontró que, después de la activación del receptor TLR4, el receptor CB₂ se localiza primero en compartimentos positivos para Rab7 y, posteriormente, en vesículas positivas para LAMP-2. La proteína Rab7 controla el tráfico de los GPCRs hacia endosomas tardíos para finalmente dirigirlos a lisosomas (Seachrist & Ferguson 2003), por lo que los datos obtenidos en este estudio demuestran que los receptores CB₂ siguen la vía de degradación en respuesta al LPS en BMMCs. La co-localización del receptor CB₂ con las proteínas Rab7 y LAMP-2 concuerda con los datos de otros grupos de investigación que han reportado que la disrupción lisosomal con bafilomicina A1 (compuesto que inhibe la acidificación endosomal) inhibe la co-localización del receptor con los marcadores de endosomas tardíos y con lisosomas (Brailoiu et al. 2015).

Las CC han sido reconocidas como reguladores importantes de la respuesta inmune adaptativa; sin embargo, su participación en las respuestas protectoras innatas en contra de patógenos aún se encuentra en constante investigación (Piliponsky & Romani 2018). La actividad de estas células en las respuestas protectoras en contra de bacterias Gram negativas depende, en gran medida, de la secreción de TNF α (Supajatura et al. 2002) y puede ser observada en infecciones de baja intensidad, mientras que en infecciones de gran intensidad pueden tener el efecto contrario, incrementando los efectos deletéreos (Piliponsky et al. 2010).

La administración de LPS en la cavidad peritoneal es un modelo murino para inducir endotoxemia y choque séptico (Deitch 2005). En este modelo se observó que el 2-AG promueve un estado de refractoriedad al LPS en CC del peritoneo. Este resultado constituye la primera evidencia de que los eCN pueden inhibir las respuestas inmunes innatas dependientes de CC *in vivo*, sugiriendo que el papel negativo del 2-AG en la activación de las CC puede tener implicaciones fisiológicas.

En resumen, el presente trabajo provee evidencia que indica que la activación del receptor TLR4 promueve la síntesis de 2-AG, el cual activa a los receptores CB₂,

induciendo su tráfico a través de las vías de reciclamiento endosomal lento y de lisosomas, promoviendo la síntesis de reguladores negativos de la cascada de señalización del TLR4 y contribuyendo al establecimiento de la TE que atenúa las respuestas inmunes innatas dependientes de CC *in vivo*.

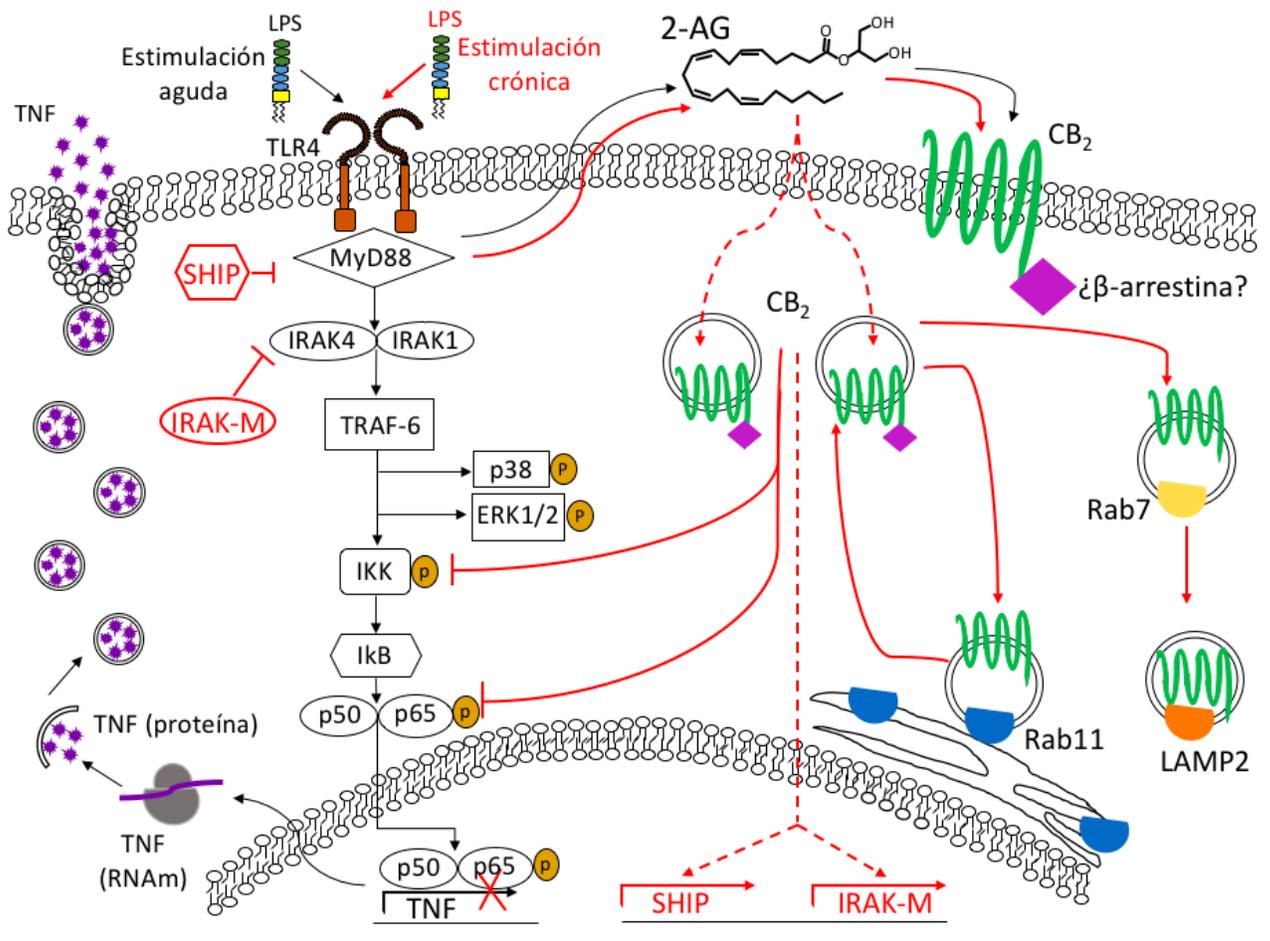


Figura 27. Producción de 2-AG dependiente de la activación del TLR4 induce TE y el tráfico vesicular del receptor CB₂ en BMMCs. Después de la activación aguda del receptor TLR4 (flechas negras), el 2-AG se produce y se activa la vía de señalización dependiente de MyD88 lo que lleva a la producción de TNF α . Después de la estimulación crónica del receptor TLR4 (flechas rojas), se producen los marcadores de tolerancia, SHIP e IRAK-M. El 2-AG activa a los receptores CB₂, inhibe la fosforilación de IKK y de la fracción p65 del NF κ B, y lleva a la producción de SHIP e IRAK-M, lo cual resulta en la disminución de la secreción de TNF α . Por otro lado, el LPS promueve el tráfico vesicular del receptor CB₂ en vesículas positivas para Rab11, Rab7 y LAMP-2, indicando que el receptor sigue las vías de reciclamiento lento y lisosomal.

9 CONCLUSIONES

Las BMMCs producen 2-AG en respuesta a la estimulación continua del receptor TLR4. Este eCN participa en la inducción de tolerancia a la endotoxina *in vitro* actuando de forma autocrina y modula la respuesta inflamatoria dependiente de CC *in vivo*.

El 2-AG contribuye al desarrollo de tolerancia al LPS, ya que inhibe la secreción de TNF α a través de la activación del receptor CB₂. Produce este efecto a través de dos mecanismos principales: a tiempos cortos, inhibe la fosforilación de IKK y NF κ B inducida por LPS, y, a tiempos largos, induce dos marcadores de tolerancia, SHIP e IRAK-M.

La estimulación de BMMCs con LPS hace que el receptor CB₂ entre a la vía de reciclamiento lento y a la vía de degradación lisosomal.

Finalmente, los resultados *in vivo* muestran que el 2-AG no sólo tiene un efecto a nivel celular, sino que también es capaz de modular las respuestas inflamatorias en un modelo murino de endotoxemia.

10 PERSPECTIVAS

El hallazgo de que el 2-AG se produce en las BMMCs en respuesta a la estimulación del TLR4 y participa en el desarrollo de tolerancia al LPS abre las puertas a la realización de experimentos que permitan determinar circunstancias que quedaron sin respuesta en el presente trabajo. Algunos de estos puntos son:

- Utilizar otras técnicas, como el uso de siRNAs para disminuir la expresión de los receptores CB₂ y comprobar los resultados obtenidos en la presente tesis.
- Investigar el mecanismo mediante el cual la estimulación del TLR4 induce la síntesis del eCN. Para esto se podría analizar la expresión y activación de las enzimas que participan en su síntesis y la relación de esta activación con moléculas como la PKA o las ROS, mencionadas en la discusión de esta tesis.
- Determinar si el 2-AG puede inducir otros marcadores de tolerancia o si la respuesta es específica sólo para las moléculas estudiadas.
- Analizar si existen otros mecanismos involucrados en la inhibición de la vía de señalización del receptor TLR4 por el 2-AG. En este caso, podría analizarse si el complejo β -arrestina/TRAF6 participa en esta inhibición como ocurre con otros GPCRs, como los receptores a opioides.
- Utilizar marcadores de otros compartimentos celulares como el retículo endoplásmico, el complejo de Golgi, la nube perinuclear para identificar de una mejor forma la localización de los receptores CB₂.
- Debido a que en algunos casos se observó que el receptor CB₂ se acerca al núcleo, identificar si estos receptores contienen alguna secuencia de aminoácidos que les permita translocarse al núcleo y si son capaces de unirse a secuencias de DNA.

ANEXO I

Expresión del RNAm de los receptores a cannabinoides

Para analizar la expresión del RNAm de los receptores a cannabinoides, se obtuvo la secuencia de cebadores reportada por McKallip y cols. en el 2002 para identificación de los dos receptores en células derivadas de ratones C57BL/6J. Para estandarizar estos cebadores en nuestro modelo celular, se realizó un gradiente de temperatura para identificar la temperatura necesaria para la fusión e hibridación de los cebadores con la cadena de DNA y la posterior amplificación del gen de interés. Una vez identificada la temperatura correcta para la amplificación del gen, se realizó un análisis del número de ciclos necesarios para encontrar la fase lineal de amplificación del mismo.

Metodología:

Purificación de RNA

El procedimiento se realizó como lo indicado en Material y Métodos en la sección 6.2.2.

RT-PCR

Para realizar la retrotranscripción (RT) del RNA, se utilizó el kit de Revert Aid (Thermofisher). La reacción se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizaron 2 µl de producto de esta reacción para lograr amplificar los RNAm de los receptores CB₁, CB₂, utilizando GAPDH como gen control. Las secuencias para la amplificación de los receptores a cannabinoides fueron las siguientes: CB₁, sentido, 5'-CGTGGGCAGCCTGTTCCCTCA-3'; antisentido, 5'-CATGCGGGCTTGGTCTGG-3'; CB₂ sentido 5'-CCGGAAAAGAGGATGGCAATGAAT-3'; antisentido 5'-CTGCTGAGCGCCCTGGAGAAC-3'. Para la GAPDH, las secuencias de los oligos fueron las siguientes: sentido 5'-TGA-AGG-TCG-GTG-TGA-ACG-GAT-TTG-GC-3' y antisentido 5'-CAT-GTA-GGC-CAT-GAG-GTC-CAC-CAC-3'.

Estos genes se amplificaron bajo las condiciones que se describen a continuación: 95 °C por 5 min, apertura de cadenas a 95 °C por 45 seg, alineamiento de oligos por 1 min en un gradiente de temperatura con los siguientes valores: 56.2, 57.3, 58.4, 59.5, 60.5, 61.4, 62.0 y 62.4 °C para el receptor CB₁ o 54.8, 55.7, 56.8, 57.9, 59.0, y 60.9 °C para el receptor CB₂, y finalmente una etapa de extensión a 72 °C por 45 seg. El ciclo se repitió 25, 30, 35, 40 o 45 veces antes de una etapa final de 7 min a 72 °C.

Las muestras se analizaron mediante electroforesis, en un gel de agarosa a 2% en TBE; se tiñeron con bromuro de etidio (Mercury) y se visualizaron con luz UV. Para conocer la longitud de las bandas obtenidas, se utilizó el marcador de tamaño de DNA (ThermoFisher). El análisis densitométrico de las bandas se hizo a partir de la imagen capturada por el equipo MiniBis Pro de Biolmaging Systems.

Resultados:

Con respecto a la identificación del receptor CB₁ se puede observar que la temperatura a la que se obtuvo la amplificación del gen sin productos inespecíficos fue de 58.4°C y la fase lineal para su amplificación fue de los 25 a 30 o 35 ciclos, presentándose una fase de meseta de los 35 ciclos en adelante. El producto que se obtuvo después de realizar la PCR (tanto para la temperatura, como para el número de ciclos) fue de 403 pares de bases (pb) como lo reportado por McKallip y colaboradores en el 2002 (Mckallip et al. 2009) (**Figura 28A**). Por otro lado, como se muestra en la **Figura 28B**, la temperatura adecuada para la identificación del receptor CB₂ fue de 60.9°C y la fase lineal de amplificación se encontró entre los 30 y 35 ciclos. El producto de la PCR obtenido para el receptor CB₂ fue de 479 pb, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente utilizando los mismos cebadores empleados en este estudio (McKallip et al., 2002).

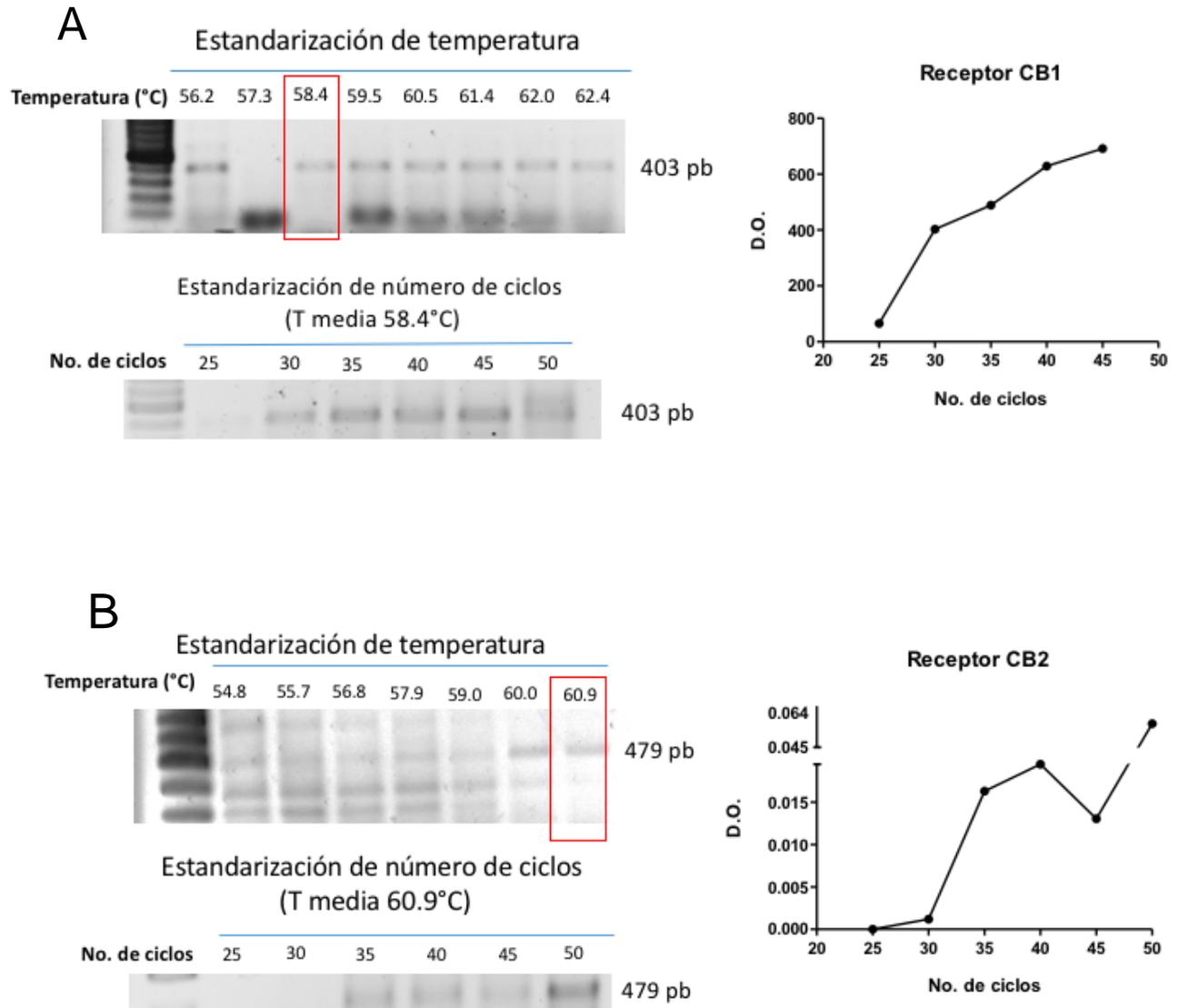


Figura 28. Estandarización de las condiciones de PCR para la identificación de los RNAm de los receptores a cannabinoides **A.** Estandarización de los cebadores para la identificación del RNAm del receptor CB₁ mediante RT-PCR. **B.** Estandarización de los cebadores para la identificación RNAm del receptor CB₂ mediante RT-PCR. Se muestra la imagen representativa de 2 experimentos independientes.

ANEXO II

Expresión de los receptores CB₁ en BMMCs

Como parte del estudio que se realizó de los receptores a cannabinoides, también se analizó la expresión y distribución del receptor CB₁ en las BMMCs. Debido a que los datos obtenidos indicaron que la tolerancia inducida por el 2-AG dependía del receptor CB₂, ya no se continuó con el análisis del CB₁. Sin embargo, a continuación, se muestran datos preliminares de la distribución de este receptor.

Metodología:

Para realizar este procedimiento, las BMMCs sensibilizadas y cultivadas en medio RPMI se pasaron a PBS y se colocaron en laminillas cargadas positivamente por 30 min para lograr la adhesión de las células. Finalizando el tiempo de adhesión, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 15 minutos y, posteriormente, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con cloruro de amonio por 10 min para bloquear los grupos aldehído que se forman después de la fijación y evitar la autofluorescencia. Después de dos lavados con PBS, las células se bloquearon durante 1 h con solución de bloqueo compuesta de 1% de BSA, 5% de suero de burro y 0.1% de tween20. Concluido el tiempo de bloqueo, las células se co-incubaron con faloidina y anticuerpos primarios específicos durante toda la noche. El anticuerpo primario empleado, y las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: CB₁ 1:50, y faloidina acoplada a rodamina (1:1000). Al siguiente día, las laminillas se lavaron por 10 ocasiones con PBS y el anticuerpo secundario correspondiente se colocó en las células a una concentración 1:200 durante 2 h. El anticuerpo secundario empleado fue anti-conejo acoplado a AlexaFluor488. Después de lavar el anticuerpo secundario por 15 ocasiones con PBS, las células se incubaron con 4',6 diamino-2-2 fenilindol (DAPI) a una concentración de 300 nM por 5 min para la tinción de los núcleos. El DAPI se eliminó de las laminillas realizando 5 lavados con PBS. Finalmente, se añadió el reactivo DABCO con la finalidad de evitar el desvanecimiento de la señal fluorescente y las laminillas se sellaron con esmalte transparente. Las células

fueron analizadas por microscopía confocal utilizando un microscopio Carl-Zeiss LSM800.

Resultados:

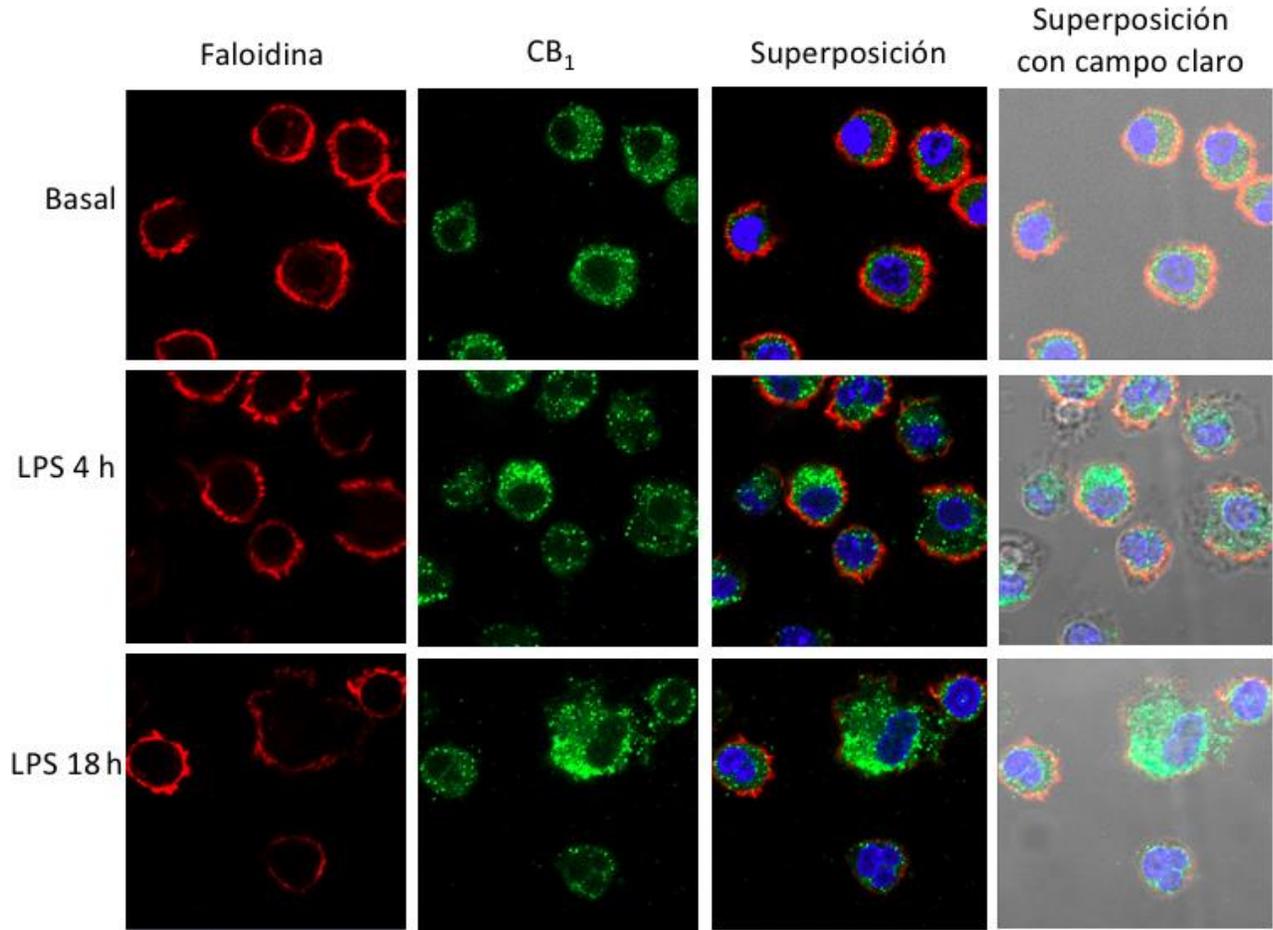


Figura 29. El receptor CB₁ se localiza en regiones intracelulares en BMMCs. Las BMMCs fueron tratadas para inmunofluorescencia. La figura muestra las imágenes tomadas en microscopio confocal con la actina cortical en rojo, el receptor CB₁ en verde, y los núcleos teñidos con DAPI en color azul.

ANEXO III

Transfección de BMMCs con plásmidos para la sobreexpresión de las diferentes proteínas Rab

Con la finalidad de estudiar la localización del receptor CB₂ en los distintos compartimentos intracelulares en las BMMCs, se emplearon dos aproximaciones experimentales. La primera fue el uso de anticuerpos para marcar a las diferentes proteínas Rab (mostrada en la sección de resultados de esta tesis) y la segunda fue la transfección de células con plásmidos (Rab-EGFP) para la sobreexpresión de las mismas. Debido a que la sobreexpresión de las proteínas Rab induce una marca menos clara que la de los anticuerpos y esto podía alterar los resultados de co-localización con el receptor CB₂, y a que la eficiencia en la transfección es baja, únicamente se emplearon los resultados de las inmunofluorescencias con anticuerpos para las cuantificaciones de co-localizaciones mostradas en el presente trabajo. Sin embargo, a continuación, se exponen la metodología y los resultados obtenidos con las transfecciones.

Metodología:

Un millón de BMMCs por condición se resuspendieron en medio RPMI sin suero a una concentración de 10 millones por mililitro. A cada millón de células se les agregó los plásmidos correspondientes para la sobreexpresión de Rab5, Rab7 y Rab11. Se empleó la cantidad de 10 µg de plásmido para cada transfección. Los grupos fueron divididos en tubos eppendorf de 1.5 ml como se muestra a continuación:

1. 1X10⁶ células+10 µg de plásmido para Rab5
2. 1X10⁶ células+10 µg de plásmido para Rab7
3. 1X10⁶ células+10 µg de plásmido para Rab11
4. 1X10⁶ células sin plásmido

Las células y los vectores se mezclaron suavemente y se pasaron a una celda de transfección (Nepagen) la cual fue colocada en un electroporador NEPA 21 (Nepagen). Para el pulso de poración en BMMCs se siguió el protocolo que se muestra a

continuación: 275 V, con una duración de 3ms y un intervalo de 50 ms, el número de pulsos de poración fueron 2, y el % de D. rate fue de 10 con una polaridad positiva. Para los pulsos de transferencia, los parámetros fueron los siguientes: 20 V con una duración de 50 ms, un intervalo de 50 ms, un número total de 5 pulsos de transferencia con un porcentaje de D. rate de 40 y una polaridad \pm . Después de la electroporación, se añadieron 900 μ L de medio con suero a cada alícuota de células y estas fueron transferidas a una placa de 24 pozos en donde se dejaron por 48 horas para posteriormente realizar el protocolo de inmunofluorescencia para el receptor CB₂. Finalmente, las células se analizaron en el microscopio confocal Carl-Zeiss LSM780.

Resultados

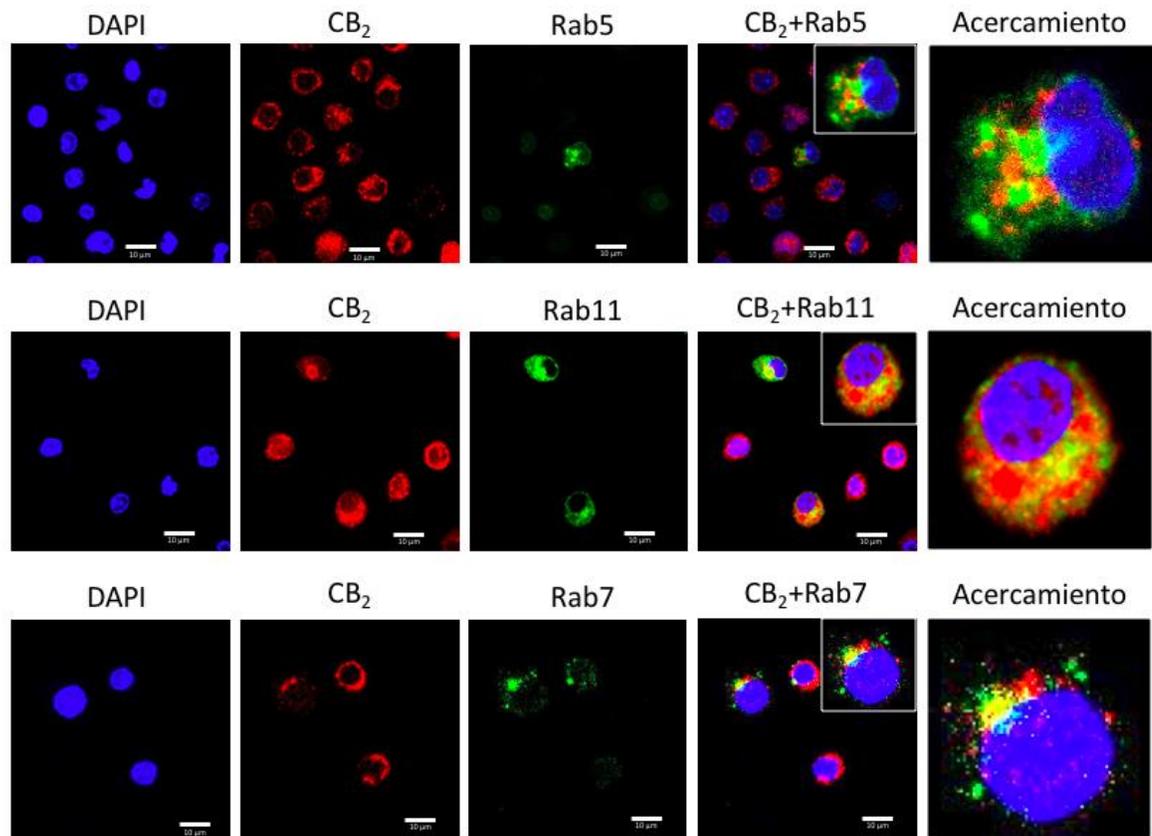


Figura 30. Transfección de proteínas Rab en BMSCs. Las BMSCs fueron transfectadas con plásmidos para las proteínas Rab que se indican en las figuras. Posteriormente, las células fueron tratadas para inmunofluorescencia. La figura muestra las imágenes tomadas en microscopio confocal con el receptor CB₂ en rojo, las proteínas Rab en verde y los núcleos teñidos con DAPI en color azul. Barra de calibración: 10 μ m.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, N. et al., 2017. Endocannabinoid system acts as a regulator of immune homeostasis in the gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(19), pp.5005–5010.
- Akira, S. & Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4(7), pp.499–511.
- Aloe, L., Leon, A. & Levi-Montalcini, R., 1993. A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents and Actions*, 39(1), pp.C145--C147.
- Arenas, J., 2014. Bacterial Lipopolysaccharide as Adjuvants. In M. Giese, ed. *Molecular Vaccines: From Prophylaxis to Therapy - Volume 2*. Cham: Springer International Publishing, pp. 527–536.
- Avila, M. & Gonzalez-Espinosa, C., 2011. Signaling through Toll-like receptor 4 and mast cell-dependent innate immunity responses. *IUBMB Life*, 63(10), pp.922–929.
- Bakali, E. & Tincello, D.G., 2013. Cannabinoids and the Urinary Bladder. *Gynecology and Obstetrics* , 3(4).
- Berdyshev, E. V et al., 2001. Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(12), pp.2171–2178.
- Biswas, S.K. & Lopez-Collazo, E., 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology*, 30(10), pp.475–487.

- Blank, U. et al., 2014. Vesicular Trafficking and Signaling for Cytokine and Chemokine Secretion in Mast Cells. *Frontiers in Immunology*, 5(September), pp.1–18.
- Bouaboula, M. et al., 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochemical Journal*, 641, pp.637–641.
- Brailoiu, G.C. et al., 2015. Differential Activation of Intracellular versus Plasmalemmal CB2 Cannabinoid Receptors. *Biochemistry*, 53(30), pp.4990-4999.
- Calebiro, D. & Godbole, A., 2018. Internalization of GPCRs: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 32(2), pp.83–91.
- Carayon, P. et al., 1998. Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation. *Blood*, 92(10), pp.3605–15.
- Castaneda, J.T. et al., 2013. Differential expression of intracellular and extracellular CB2 cannabinoid receptor protein by human peripheral blood leukocytes. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(1), pp.323–332.
- Chang, Y.-H., Lee, S.T. & Lin, W.-W., 2001. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: Involvement of eicosanoids. *Journal of Cellular Biochemistry*, 81(4), pp.715–723.
- Chiurchiù, V., 2016. Endocannabinoids and Immunity. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), pp.59–66.
- Chiurchiu, V., Battistini, L. & Maccarrone, M., 2015. Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. *Immunology*, 144(3), pp.352–364.

- Correa, F. et al., 2005. Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. *British Journal of Pharmacology*, 145(4), pp.441–448.
- Croxford, J.L. & Yamamura, T., 2005. Cannabinoids and the immune system: Potential for the treatment of inflammatory diseases? *Journal of Neuroimmunology*, 166(1), pp.3–18.
- Cruz, S.L. et al., 2018. Anandamide inhibits FcεRI-dependent degranulation and cytokine synthesis in mast cells through CB2 and GPR55 receptor activation. Possible involvement of CB2-GPR55 heteromers. *International Immunopharmacology*, 64, pp.298–307.
- Deitch, E.A., 2005. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock*, 24(SUPPL. 1), pp.19–23.
- Demuth, D.G. & Molleman, A., 2006. Cannabinoid signalling. *Life Sciences*, 78, pp.549–563.
- Dhopeshwarkar, A. & Mackie, K., 2014. CB2 Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target--What Does the Future Hold? *Molecular Pharmacology*, 86(4), pp.430–437.
- Di Marzo, V. et al., 1999. Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *European Journal of Biochemistry*, 264(1), pp.258–267.
- Facchinetti, F. et al., 2003. Cannabinoids ablate release of TNFα in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia*, 41(2), pp.161–168.
- Fan, H. & Cook, J.A., 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *Journal of Endotoxin Research*, 10(2), pp.71–84.

- Galanos, C. & Freudenberg, A., 1993. Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action. *Mediators of Inflammation*, 2, pp.11–16.
- Galiègue, S. et al., 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Biochemistry*, 61, pp.54–61.
- Gallily, R., Breuer, A. & Mechoulam, R., 2000. 2-Arachidonylglycerol an endogenous cannabinoid, inhibits Tumor Necrosis Factor- α Production in Murine Macrophages, and in Mice. *European Journal of Pharmacology*, pp.1997–1999.
- Germain, N. et al., 2002. Effect of the cannabinoid receptor ligand, WIN 55,212-2, on superoxide anion and TNF- α production by human mononuclear cells. *International immunopharmacology*, 2(4), pp.537–43.
- Gonsiorek, W. et al., 2000. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*, 57(5), pp.1045–1050.
- Gribar, S.C. et al., 2008. No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 14(9–10), pp.645–659.
- Grimbaldeston, M.A. et al., 2005. Mice as a Model for Investigating Mast Cell Biology in Vivo. *The American Journal of Pathology*, 167(3), pp.835–848.
- Grimsey, N.L. et al., 2011. Cannabinoid receptor 2 undergoes Rab5-mediated internalization and recycles via a Rab11-dependent pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(8), pp.1554–1560.

- Guha, M. & Mackman, N., 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), pp.32124–32132.
- Gui, H. et al., 2013. Cannabinoid Receptor 2 Protects against Acute Experimental Sepsis in Mice. *Mediators of Inflammation*, 2013, pp.1–10.
- Hashimotodani, Y. et al., 2013. Acute inhibition of diacylglycerol lipase blocks endocannabinoid-mediated retrograde signalling: Evidence for on-demand biosynthesis of 2-arachidonoylglycerol. *Journal of Physiology*, 591(19), pp.4765–4776.
- He, Q. et al., 2018. Cannabinoid receptor 2: a potential novel therapeutic target for sepsis? *Acta Clinica Belgica*, pp.1–5.
- Hesselink, J.M.K., 2013. Pain & Relief. , 2(1), pp.1–5.
- Hilger, D., Masureel, M. & Kobilka, B.K., 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1), pp.4–12.
- Hillard, C.J., 2017. Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? *Neuropsychopharmacology*, 43, p.155.
- Huynh, K.K. et al., 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO Journal*, 26(2), pp.313–324.
- Ibsen, M.S., Connor, M. & Glass, M., 2017. Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptor Signaling and Bias. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), pp.48–60.

- Jean-Alphonse, F. & Hanyaloglu, A.C., 2011. Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 331(2), pp.205–214.
- Jeon, Y.J. et al., 1996. Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of nuclear factor-kappa B/Rel activation. *Mol Pharmacol*, 50(2), pp.334–341.
- Jiang, S. et al., 2007. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 2(7), pp.1–8.
- Jiménez-Andrade, G.Y. et al., 2013. Immunoglobulin e induces VEGF production in mast cells and potentiates their pro-tumorigenic actions through a Fyn kinase-dependent mechanism. *Journal of Hematology and Oncology*, 6(1), pp.1–14.
- St. John, A.L. & Abraham, S.N., 2013. Innate Immunity and Its Regulation by Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 190(9), pp.4458–4463.
- Karima, R. et al., 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today*, 4310(March), pp.123–132.
- Kawai, T. & Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11, p.373.
- Kawasaki, T. & Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), pp.1–8.
- Keck, S. et al., 2011. Absence of TRIF Signaling in Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 186(9), pp.5478–5488.

- Kelly, N.M., Young, L. & Cross, A.S., 1991. Differential induction of tumor necrosis factor by bacteria expressing rough and smooth lps. , 59(12), pp.4491–4496.
- Klein, T.W., 2005. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature reviews. Immunology* , 5(May), pp.400–411.
- Kleyer, J. et al., 2012. Cannabinoid receptor trafficking in peripheral cells is dynamically regulated by a binary biochemical switch. *Biochemical Pharmacology*, 83(10), pp.1393–1412.
- Krishnan, G. & Chatterjee, N., 2012. Endocannabinoids alleviate proinflammatory conditions by modulating innate immune response in muller glia during inflammation. *Glia*, 60(11), pp.1629–1645.
- Krystal-Whittemore, M., Dileepan, K.N. & Wood, J.G., 2016. Mast cell: A multi-functional master cell. *Frontiers in Immunology*, 6(JAN), pp.1–12.
- Lohse, M.J. & Hoffmann, C., 2014. Arrestin Interactions with G Protein-Coupled Receptors, *Handbook of Experimental Pharmacology*.
- Lourbopoulos, A. et al., 2011. Administration of 2-arachidonoylglycerol ameliorates both acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Research*, 1390, pp.126–141.
- Lu, H.-C. & Mackie, K., 2016. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biological psychiatry*, 79(7), pp.516–525.
- Lu, Y. et al., 2014. Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects primary cultured neurons against LPS-induced impairments in rat caudate nucleus. *Journal of Molecular Neuroscience*, 54(1), pp.49–58.

- Maccarrone, M. et al., 2016. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. , 36(5), pp.277–296.
- Madera-Salcedo, I.K., Cruz, S.L. & Gonzalez-Espinosa, C., 2013. Morphine Prevents Lipopolysaccharide-Induced TNF Secretion in Mast Cells Blocking I B Kinase Activation and SNAP-23 Phosphorylation: Correlation with the Formation of a - Arrestin/TRAF6 Complex. *The Journal of Immunology*, 191(6), pp.3400–3409.
- Martín-Ávila, A. et al., 2016. Protein Tyrosine Kinase Fyn Regulates TLR4-Elicited Responses on Mast Cells Controlling the Function of a PP2A-PKC α/β Signaling Node Leading to TNF Secretion. *The Journal of Immunology*, 196(12), pp.5075–5088.
- Martínez-Cuevas. Diferencias en el tráfico vesicular y señalización del receptor μ activado por morfina y fentanilo en células cebadas: posible participación del receptor TLR4 (Tesis de maestría no publicada). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N., México.
- Matthews, A.T. et al., 2016. Oxyradical stress increases the biosynthesis of 2-arachidonoylglycerol: involvement of NADPH oxidase. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 311(6), pp.C960–C974.
- Mckallip, R.J. et al., 2009. Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Control*, 100(2), pp.627–634.
- Medina-Tamayo, J. et al., 2011. IgE-dependent sensitization increases responsiveness to LPS but does not modify development of endotoxin tolerance in mast cells. *Inflammation Research*, 60(1), pp.19–27.
- Medvedev, A.E., Kopydlowski, K.M. & Vogel, S.N., 2000. Inhibition of Lipopolysaccharide-

Induced Signal Transduction in Endotoxin-Tolerized Mouse Macrophages: Dysregulation of Cytokine, Chemokine, and Toll-Like Receptor 2 and 4 Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 164(11), pp.5564–5574.

Medvedev, a E. et al., 2001. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(4), pp.2257–67.

Merighi, S. et al., 2012. Cannabinoid CB2 receptor attenuates morphine-induced inflammatory responses in activated microglial cells. *British Journal of Pharmacology*, 166(8), pp.2371–2385.

Moon, T.C. et al., 2010. Advances in mast cell biology: New understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunology*, 3(2), pp.111–128.

More, S.V. et al., 2013. Anti-neuroinflammatory Activity of a Novel Cannabinoid Derivative by Inhibiting the NF- κ B Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Induced BV-2 Microglial Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 121(2), pp.119–130.

Mukai, K. et al., 2018. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunological Reviews*, 282(1), pp.121–150.

Mukherjee, S., Karmakar, S. & Babu, S.P.S., 2016. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: A review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), pp.193–204.

Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, p.61.

- Neish, A.S., 2018. Acute inflammation: endogenous cannabinoids mellow the harsh proinflammatory environment. *J Clin Invest*, 128(9), pp.3750–3751.
- Nogueras-Ortiz, C. & Yudowski, G.A., 2016. The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. *Molecular Pharmacology*, 90(5), p.620 LP-626.
- Opal, S.M., 2010. Endotoxins and Other Sepsis Triggers. *Contributions to Nephrology*, 167, pp.14–24.
- Pandey, R. et al., 2009. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmaceutical Research*, 5(1), pp.6271–6279.
- Panikashvili, D. et al., 2006. The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiology of Disease*, 22(2), pp.257–264.
- Park, B.S. & Lee, J.O., 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental and Molecular Medicine*, 45(12).
- Parolaro, D. et al., 2002. Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 66(2), pp.319–332.
- Pertwee, R.G. & Ross, R.A., 2002. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 66(2), pp.101–121.
- Piliponsky, A.M. et al., 2010. Mast cell-derived TNF can exacerbate mortality during severe bacterial infections in C57BL/6-Kit^{W-sh/W-sh} mice. *American Journal of Pathology*, 176(2), pp.926–938.
- Piliponsky, A.M. & Romani, L., 2018. The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity. *Immunological Reviews*, 282(1), pp.188–197.

- Reggio, P.H., 2010. Endocannabinoid Binding to the Cannabinoid Receptors: What Is Known and What Remains Unknown. *Current medicinal chemistry*, 17(14), pp.1468–1486.
- Reisenberg, M. et al., 2012. The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1607), pp.3264–3275.
- Rom, S. & Persidsky, Y., 2013. Cannabinoid Receptor 2: Potential Role in Immunomodulation and Neuroinflammation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(3), pp.608–620.
- Román-Figueroa. 2017. Caracterización de las posibles vías de señalización activadas por LPS en células cebadas (Tesis de maestría). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N, México.
- Roque, M.E. et al., 1998. Can phosphorylation and dephosphorylation of rod outer segment membranes affect phosphatidate phosphohydrolase and diacylglycerol lipase activities? *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 119(1), pp.85–93.
- Rosenberger, T.A., Farooqui, A.A. & Horrocks, L.A., 2007. Bovine brain diacylglycerol lipase: Substrate specificity and activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Lipids*, 42(3), pp.187–195.
- Rozenfeld, R., 2011. Type I cannabinoid receptor trafficking: All roads lead to lysosome. *Traffic*, 12(1), pp.12–18.
- Rozengurt, E., 2007. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3), pp.589–602.

- Rubovitch, V., Gafni, M. & Sarne, Y., 2004. The involvement of VEGF receptors and MAPK in the cannabinoid potentiation of Ca²⁺flux into N18TG2 neuroblastoma cells. *Molecular Brain Research*, 120(2), pp.138–144.
- Ryberg, E. et al., 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British journal of pharmacology*, 152(7), pp.1092–1101.
- Samson, M.-T. et al., 2003. Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(10), pp.4953–4962.
- Sandig, H. & Bulfone-Paus, S., 2012. TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Frontiers in Immunology*, 3, p.185.
- Sato, S. et al., 2000. Synergy and Cross-Tolerance Between Toll-Like Receptor (TLR) 2- and TLR4-Mediated Signaling Pathways. *The Journal of Immunology*, 165(12), pp.7096–7101.
- Scotter, E., Graham, S. & Glass, M., 2009. The Cannabinoid Receptors. , (January).
- Seachrist, J.L. & Ferguson, S.S.G., 2003. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sciences*, 74(2–3), pp.225–235.
- Singh, A. et al., 2016. The IRAK-ERK-p67phox-Nox-2 axis mediates TLR4, 2-induced ROS production for IL-1 β transcription and processing in monocytes. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(6), pp.747–763.
- Sly, L.M. et al., 2004. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity*, 21(2), pp.227–239.
- Small-Howard, A.L. et al., 2005. Anti-inflammatory potential of CB1-mediated cAMP elevation in mast cells. *The Biochemical journal*, 388(Pt 2), pp.465–473.

- Song, Chao & Howlett, Allyn, 1995. Rat cannabinoid receptors are N-linked glycosylated proteins. *Life sciences*. 56. 1983-9.
- Song, J. et al., 2007. A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. *PLoS Pathogens*, 3(4), pp.541–552.
- Sugiura, T. et al., 2006. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Progress in Lipid Research*, 45(5), pp.405–446.
- Sugiura, T. & Waku, K., 2000. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chemistry and Physics of Lipids*, 108(1–2), pp.89–106.
- Sun, Y. & Shang, D., 2015. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Mediators of inflammation*.
- Supajatura, V. et al., 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J.Clin.Invest.*, 109(10), p.1351-.
- Supajatura, V. et al., 2001. Protective Roles of Mast Cells Against Enterobacterial Infection Are Mediated by Toll-Like Receptor 4. *The Journal of Immunology*, 167(4), pp.2250–2256.
- Thi, O. et al., 2014. Phosphoinositide turnover in Toll-like receptor signaling and trafficking. *BMB reports*, 47(7), pp.361–368.
- Ueda, N. & Tsuboi, K., 2012. Discrimination between Two Endocannabinoids. *Chemistry & Biology*, 19(5), pp.545–547.
- Varga, R. et al., 1998. Cannabinoids Are Involved in Endotoxin-Induced Hypotension. *FASEB Journal*, pp.1035–1044.

- Wang, S. et al., 2017. Rab25 GTPase: Functional roles in cancer. *Oncotarget*, 8(38), pp.64591–64599.
- West, M.A. & Heagy, W., 2002. Endotoxin tolerance: A review. *Critical Care Medicine*, 30(1), S64-S73.
- Williams, J. T., et al., 2013. Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacological reviews*, 65(1), 223-54.
- Wood, J.T. et al., 2008. Comprehensive profiling of the human circulating endocannabinoid metabolome: clinical sampling and sample storage parameters. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 46(9), pp.1289–1295.
- Woodman, P.G., 2000. Biogenesis of the Sorting Endosome: The Role of Rab5. *Traffic*, 1(9), pp.695–701.
- Xu, H., Bin, N.-R. & Sugita, S., 2018. Diverse exocytic pathways for mast cell mediators. *Biochemical Society transactions*, (January), p.BST20170450.
- Zerial, M. & McBride, H., 2001. Rab proteins as membrane organisers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(3), pp.107–117.
- Zhao, Y. et al., 2010. WIN55212-2 ameliorates atherosclerosis associated with suppression of pro-inflammatory responses in ApoE-knockout mice. *European Journal of Pharmacology*, 649(1–3), pp.285–292.
- Zou, S. & Kumar, U., 2018. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3).