

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

**Departamento de Farmacobiología**

**Efecto de la activación de los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  y del estrés crónico  
sobre la secreción de TNF inducida por LPS en células cebadas**

Tesis que presenta

**M. en C. Fabiola Guzmán Mejía**

Para obtener el grado de

**Doctora de en Ciencias en**

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directoras de la tesis:

Dra. Claudia González Espinosa

Dra. Carolina López Rubalcava

Ciudad de México

Noviembre del 2017

Todos los experimentos se realizaron en los laboratorios 11 y 17 del departamento de Farmacobiología de la Sede Sur del Cinvestav, gracias a los proyectos: Conacyt-ANR 188565 y Conacyt FC-1122 a cargo de la Dra. Claudia González Espinosa y Conacyt CB-155255 a cargo de la Dra. Carolina López Rubalcava. Fabiola Guzmán Mejía recibió la beca de doctorado No. 243361.

*Dedicatoria*

*A mi mamá por su apoyo incondicional.  
Eres la persona que más admiro y amo en la vida.  
Gracias por todo.*

## **Agradecimientos**

A la Dra. Claudia González Espinosa y a la Dra. Carolina López Rubalcava por guiarme durante este gran camino. Gracias por todas sus enseñanzas, son un ejemplo a seguir.

A las doctoras Silvia Cruz Martín del Campo, Patricia de Gortari Gallardo, Marina Macías Silva y Gabriela Rodríguez Manzo porque gracias a las sugerencias emitidas en cada presentación y durante la escritura de la tesis nos permitieron elaborar un mejor trabajo.

A Alfredo Ibarra Sánchez y a Isabel Beltrán Villalobos por enseñarme y asistirme con las técnicas empleadas en este proyecto, y por su enorme paciencia. Gracias por ser excelentes maestros.

Al personal de la UPEAL-Cinvestav Ricardo Gaxiola Centeno, Víctor Manuel García Gómez, Benjamín Chávez Álvarez y Ramón Gómez Martínez por su apoyo en el cuidado y mantenimiento de las cepas de ratones utilizadas en este trabajo.

A mis amigos de Cinvestav Martín Ávila, Karla Ramírez, Zyanya Espinosa, Elizabeth Sánchez, Luz Molina, Paulina Soberanes, Monserrat Armenta y Osmar Jaramillo por sus consejos, su compañía, su cariño, y por las palabras de aliento que llegaron siempre en el momento oportuno.

A Lula Medina y a Fabián Meza por compartir conmigo este gran camino.

A mi familia por su cariño y apoyo incondicional, son lo más valioso de mi vida.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>1. ESTRÉS .....</b>	<b>13</b>
1.1 El estresor.....	13
1.2 La respuesta al estrés.....	13
<b>2. LAS CÉLULAS CEBADAS (CC) .....</b>	<b>15</b>
2.1 Las CC en la inmunidad innata.....	16
2.2 Activación del receptor tipo toll 4 (TLR-4) en las células cebadas .....	16
2.3 Producción y secreción de TNF en CC estimuladas con LPS. ....	17
2.4 Efecto de la activación del TLR-4 en modelos <i>in vivo</i> .....	19
<b>3. EL ESTRÉS Y SUS EFECTOS EN LAS CÉLULAS CEBADAS .....</b>	<b>20</b>
3.1 El nervio vago como modulador de la respuesta inmune innata dada por la activación del TLR-4.....	21
3.2 Moléculas participantes en el reflejo anti-inflamatorio colinérgico .....	22
3.3 Mecanismos de señalización de los nAChR. ....	24
<b>4 PAPEL DE LOS NACHRA7 EN LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE.....</b>	<b>25</b>
4.1 Vía de señalización involucrada en la inhibición de la secreción de mediadores inflamatorios estimulada por el receptor nAChR $\alpha$ 7. ....	25
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES .....</b>	<b>29</b>
<b>PRIMERA SECCIÓN .....</b>	<b>30</b>

---

<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>SEGUNDA SECCIÓN.....</b>	<b>64</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>64</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>69</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>85</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO 3 .....</b>	<b>90</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Sistema de señalización del TLR-4 en células cebadas.	18
Figura 2. Niveles de TNF secretados por la administración i.p de LPS en ratones SW y C57BL/6J.	19
Figura 3. Representación esquemática del reflejo antiinflamatorio colinérgico.	22
Figura 4. Características de los nAChR.	24
Figura 5. Efectos de la administración de 0.25 mg/kg de GTS-21 sobre la secreción peritoneal de TNF en respuesta a LPS.	41
Figura 6. Presencia de las distintas subunidades del receptor nicotínico en BMMCs.	42
Figura 7. Funcionalidad de los receptores nAChR $\alpha$ 7 en BMMCs.	43
Figura 8. El GTS-21 no estimula la secreción de $\beta$ -hexosaminidasa.	44
Figura 9. Los agonistas nicotínicos inhiben la secreción de TNF inducida por LPS en BMMCs	45
Figura 10. El GTS-21 previene la secreción del TNF preformado y del sintetizado <i>de novo</i> .	46
Figura 11. El GTS-21 afecta la secreción de CCL-2 en BMMCs estimuladas con LPS.	47
Figura 12. La cinasa IKK participa en la secreción de TNF pero no en la de CCL-2.	48
Figura 13. El GTS-21 evita la fosforilación de IKK y p65 involucradas en la síntesis y secreción de TNF inducida por LPS.	49
Figura 14. El GTS-21 evita la acumulación del RNAm del TNF inducida por LPS en BMMCs.	49

Figura 15. La proteína ERK participa en la secreción y síntesis de <i>novo</i> de TNF.	50
Figura 16. La proteína ERK participa en la secreción de TNF inducida por LPS.	51
Figura 17. La fosforilación de ERK inducida por LPS es prevenida por activación del nAChR $\alpha$ 7.	52
Figura 18. La activación de la TACE favorece el fenómeno de secreción de TNF estimulado por LPS en las BMMCs.	53
Figura 19. Participación del a TACE en la secreción de TNF inducida por LPS en BMMCs.	54
Figura 20. El calcio, la cinasa Fyn y la cinasa Lyn no intervienen en las vías antiinflamatorias del nAChR $\alpha$ 7.	55
Figura 21. Mecanismos moleculares mediante los cuales el nAChR $\alpha$ 7 previene la secreción de TNF en células cebadas estimuladas con LPS.	56
Figura 22. Participación de Jak-2 sobre la secreción de TNF inducida por LPS en células cebadas.	57
Figura 23. Principales moléculas que participan en la producción de TNF dependiente de TLR4 en las células cebadas.	63
Figura 24. Efecto del estrés crónico ligero impredecible y por aislamiento social sobre la secreción de TNF inducida por LPS en las células cebadas de la cavidad peritoneal.	72
Figura 25. Efecto del estrés crónico impredecible y del estrés por aislamiento social sobre la producción de corticosterona en respuesta al LPS.	73
Figura 26. Efecto del estrés crónico en los niveles de vasopresina en suero es respuesta al LPS.	74
Figura 27. Evaluación del tiempo acumulado de inmovilidad en la prueba de nado forzado en ratones sometidos a estrés crónico ligero o estrés por aislamiento social.	75

Figura 28. Evaluación del tiempo acumulado en el centro de la caja durante la prueba de campo abierto en ratones sometidos a estrés crónico impredecible o a estrés por aislamiento social.	76
Figura 29. Efectos del estrés en la conducta tipo ansiedad en laberinto elevado en cruz en ratones sometidos al modelo de estrés crónico impredecible y al de estrés por aislamiento social.	76
Figura 30. Modulación de la respuesta inmune innata por acción de los mediadores del estrés crónico.	84
Figura 31. Efectos del estrés en la secreción de TNF inducida por LPS en células cebadas, aproximaciones <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	86
Figura 32. Efecto del estrés crónico sobre las concentraciones plasmáticas de TNF estimuladas por LPS.	88
Figura 33. Efectos del estrés crónico impredecible sobre el consumo de agua azucarada en ratones SW y C57BL/6J.	89
Figura 34. Efecto del ECI en la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS.	90
Figura 35. Efecto del ECI sobre la secreción de corticosterona inducida por LPS en ratones C57BL/6J	91
Figura 36. Efecto del ECI en el tiempo acumulado de inmovilidad durante la prueba del nado forzado en ratones C57BL/6J.	92

**ABREVIATURAS**

ADR Adrenalina

Ag Antígeno

AMPc 3',5'-adenosina monofosfato cíclico

ANOVA Análisis de varianza

AP-1 Proteína de activación 1

BMMCs Células cebadas derivadas de médula ósea

Ca<sup>2+</sup> Calcio

CC célula cebada

CLP Ligadura y punción del ciego

CRH Hormona liberadora Corticotropina

DAMP Patrones moleculares asociados al peligro

DSM- IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

EAS Estrés por aislamiento social

ECI Estrés crónico impredecible

ELISA Inmuno ensayo ligado a enzima

ERK1/2 Cinasas reguladas por señales extracelulares

GPCR Receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G

GRKs Cinasas del receptor acoplado a proteína G

HHA Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

IgE Inmunoglobulina E

IKK Cinasas de IκB

IL Interleucina

INF Interferón

IP3 Inositoltrifosfato

IRAK Cinasas asociadas al receptor de IL-1

IRF Factor regulador del interferón

IκB Inhibidor de NF-κB

JNK Cinasas del amino terminal de c-Jun

JAK-2 Janus cinasa 2

LBP Proteína de unión al LPS

LPS Lavado peritoneal

LPS Lipopolisacárido

LRR Motivos repetidos de leucina

Mal Adaptador tipo MyD88

MAPKs Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MyD88 Proteína 88 de respuesta de diferenciación primaria mieloide

nAchRα7 Receptor nicotínico alfa 7

NF Nado Forzado  
NF- $\kappa$ B Factor nuclear  $\kappa$ B  
NGF Factor de crecimiento nervioso  
NK Células asesinas naturales  
PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos  
PBMCs Células sanguíneas mononucleares periféricas  
PBS Solución amortiguadora de fosfatos  
PI3K Proteína cinasa 3- fosfatidilinositol  
PIP2 fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato  
PIP3 fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato  
PKA Cinasa dependiente de AMPc  
PKA Proteína cinasa A  
PKC Proteína cinasa C  
PLA Fosfolipasa A  
PLC Fosfolipasa C  
SCF Factor de crecimiento de células pluripotenciales  
SNAP Proteínas asociadas al sinaptosoma  
SNARE Receptores de proteínas de acoplamiento de factores solubles sensibles a N-etilmaleimida  
SNC Sistema nervioso central  
SNP Sistema nervioso parasimpático  
SNS Sistema nervioso simpático  
TAB Proteína de unión a TAK1  
TAK Cinasa activada por el TGF- $\beta$   
TGF- $\beta$  Factor de crecimiento transformante - $\beta$   
TIR Dominios homólogos al receptor de IL-1  
TIRAP Proteínas asociadas a TIR  
TLRs Receptores tipo *Toll*  
TNF Factor de necrosis tumoral  
TRAF Factor asociado al receptor de TNF  
TRAM Moléculas adaptadoras relacionadas a TRIF  
TRIF Dominio TIR que contiene adaptadores de proteínas inducidas por el IFN- $\beta$   
VAMP Proteínas membranales asociadas a vesículas  
WB Western blot  
Kit<sup>Wsh/Wsh</sup>, ratones carentes de células cebadas  
WT Tipo silvestre

## RESUMEN

La respuesta al estrés desencadena la producción de diferentes mediadores neuroendocrinos que modifican algunas funciones fisiológicas, entre ellas, la respuesta inmune. Las células cebadas (CC) son conocidas como importantes efectores de la inmunidad adaptativa en las alergias, pero también ha comenzado a generarse evidencia sobre su participación en las respuestas inmunes innatas desencadenadas por los receptores tipo Toll (TLRs). Está bien documentado que el estrés ejerce un efecto modulador sobre las reacciones alérgicas, ya que los mediadores del estrés activan cascadas de señalización que interfieren o potencian la producción de citocinas dependientes de la activación del receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI). Sin embargo, el efecto de los mediadores de estrés en la producción de citocinas inducida por los TLR apenas comienza a ser abordado en este tipo de células. En un trabajo reciente nuestro grupo reportó que el estrés agudo inducido por el nado forzado (NF) disminuye la secreción peritoneal de TNF inducida por lipopolisacárido (LPS) en ratones de la cepa SW, que depende de las CC. En aquel estudio se reportó que la administración de mecamilamina (un antagonista de los receptores nicotínicos) previene el efecto inhibitorio que el estrés agudo tiene sobre la secreción de TNF. Esos resultados mostraron por primera vez que la secreción temprana de TNF derivada de las CC después de estímulos de inmunidad innata es controlada negativamente por el reflejo anti-inflamatorio colinérgico a través de la activación de los receptores nicotínicos para la acetilcolina (nAChR $\alpha$ 7).

Debido a esos resultados, uno de los objetivos de esta tesis fue describir los mecanismos moleculares que subyacen a la inhibición que los nAChR $\alpha$ 7 ejercen sobre la secreción de TNF inducida por LPS en un modelo de células cebadas derivadas de médula ósea (BMMCs). Por otro lado, debido a que no se conocen los efectos que el estrés crónico tiene sobre las respuestas de la inmunidad innata mediadas por las CC, fue de nuestro interés evaluar esta respuesta utilizando el modelo de estrés crónico impredecible (ECI) y el modelo de estrés por aislamiento social (EAS) en ratones SW,

además de las respuestas bioquímicas y conductuales desarrolladas en respuesta a este tipo de estrés.

Esta tesis documenta que las BMMCs tienen nAChR $\alpha$ 7 funcionales que al ser activados con un agonista específico (GTS-21) inhiben la secreción de TNF inducida por LPS. Los mecanismos moleculares involucran, como en otros tipos celulares, la inhibición de la vía IKK-NF $\kappa$ B. Además, nuestros resultados muestran que la activación del nAChR $\alpha$ 7 interfiere con la activación de la MAPK ERK1/2 que, a su vez, activa a la proteasa TACE, necesaria para el procesamiento de TNF en respuesta al LPS. Las acciones inhibitorias del nAChR $\alpha$ 7 sobre la vía de señalización del TLR-4 resultaron estar mediadas por la cinasa JAK-2.

Finalmente, los estudios realizados en ambos modelos murinos de estrés crónico demuestran que esa condición modifica de manera diferencial la secreción peritoneal de TNF dependiente de las CC inducida por LPS. El modelo de ECI incrementó la secreción de TNF en respuesta al LPS, mientras que el modelo de EAS tuvo efectos inmunosupresores. Por otro parte, este estudio encontró que las concentraciones plasmáticas de corticosterona no fueron modificadas después de la exposición crónica al estrés mientras que los niveles de vasopresina incrementaron significativamente después del estrés crónico sólo en los animales expuestos a la endotoxina en ambos modelos utilizados. Los resultados de las pruebas para evaluar las conductas tipo depresión y ansiedad muestran que el modelo de ECI genera conductas tipo depresión en la prueba de nado forzado (NF) mientras que el modelo de EAS no tuvo efectos sobre esta conducta. Ninguno de los dos modelos de estrés generó el desarrollo de conductas tipo ansiedad.

Esta tesis provee evidencia, *in vivo* e *in vitro*, que apoya la idea de que los mediadores neuroendocrinos secretados durante la respuesta al estrés agudo y crónico actúan modulando las respuestas inmunes innatas estimuladas por la activación del receptor TLR-4 que son dependientes de las CC.

## ABSTRACT

The stress response triggers the production of different neuroendocrine mediators that modify some physiological functions, including the immune response. Mast cells (MCs) are important effectors of adaptive immunity in allergies, but evidence has also begun to emerge about their involvement in the innate immune responses triggered by Toll-like receptors (TLRs). Stress exerts a modulating effect on allergic reactions, as stress mediators activate signaling cascades that interfere or potentiate the production of cytokines dependent on high affinity receptor activation for IgE (FcεRI). However, the effect of stress mediators on the production of cytokines induced by TLRs is only beginning to be addressed in this type of cells. In a recent study, our group reported that acute stress induced by forced swimming (NF) decreases the peritoneal secretion of lipopolysaccharide (LPS) induced TNF in SW mice, which is MC dependent. In that study, the administration of mecamylamine (a nicotinic receptor antagonist) was reported to prevent the inhibitory effect of acute stress on TNF secretion. These results showed for the first time that the cholinergic anti-inflammatory reflex through the activation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRα7) negatively controls early secretion of TNF-derived MCs after innate immunity stimuli.

Because of these results, one of the objectives of this thesis was to describe the molecular mechanisms underlying the inhibition of nAChRα7 on LPS-induced TNF secretion in a bone marrow-derived primed cell (BMMC) model. Also, because the effects of chronic stress on the innate immunity responses in MCs are unknown it was in our interest to evaluate this response using the unpredictable chronic stress model (ECI) and the model of social isolation stress (EAS) in SW mice, in addition to the biochemical and behavioral responses developed in response to this type of stress.

This thesis documents that BMMCs have functional nAChRα7s which, when activated with a specific agonist (GTS-21), inhibit LPS-induced TNF secretion. Molecular mechanisms involve, as in other cell types, the inhibition of the IKK-NFκB pathway. In addition, our results show that activation of nAChRα7 interferes with the activation

of MAPK ERK1/2, which in turn activates the TACE protease, necessary for the processing of TNF in response to LPS. The inhibitory actions of nAChR $\alpha$ 7 on the TLR-4 signaling pathway were mediated by JAK-2 kinase.

Finally, studies in both murine models of chronic stress demonstrate that this condition modifies LPS-induced peritoneal secretion of TNF in a differential manner. The ECI model increased TNF secretion in response to LPS, while the EAS model had immunosuppressive effects. On the other hand, this study found that plasma corticosterone concentrations were not modified after chronic stress exposure whereas vasopressin levels increased significantly after chronic stress only in animals exposed to endotoxin in both models used. The results of the tests to evaluate the behaviors type depression and anxiety show that the ECI model generates behaviors type depression in the test of forced swimming (NF) whereas the model of EAS had no effects on this behavior. None of the two stress models generated the development of anxiety-like behaviors.

This thesis provides evidence, *in vivo* and *in vitro*, that supports the idea that neuroendocrine mediators secreted during the acute and chronic stress response act by modulating innate immune responses stimulated by TLR-4 receptor activation that are dependent on MCs .

## INTRODUCCIÓN

### 1. Estrés

El estrés es una respuesta que el organismo desencadena al pensar un estímulo que amenaza su homeostasis. El estímulo puede ser físico o psicológico y de diversa duración, así la respuesta fisiológica que se desencadena no siempre es igual ni con la misma intensidad. Todos los organismos mantienen un equilibrio complejo y dinámico que constantemente está expuesto a estímulos externos e internos, llamados estresores. Para reestablecer la homeostasis, el organismo genera una serie de respuestas fisiológicas que involucran la producción y liberación de diversos mediadores neuroendocrinos<sup>1</sup>.

#### 1.1 El estresor

Dependiendo de la duración y del tipo de estímulo dañino los efectos del estrés pueden ser nocivos para la salud del individuo. El estrés agudo ocurre por periodos cortos que van de minutos a horas, mientras que el estrés crónico persiste por días, semanas e incluso meses<sup>2</sup>. Por otra parte, los estresores pueden ser clasificados de acuerdo a su intensidad, la cual se mide por los niveles de hormonas o neurotransmisores que se liberan después del estímulo, o algún otro cambio fisiológico como la presión sanguínea o el ritmo cardíaco<sup>3</sup>.

#### 1.2 La respuesta al estrés

La respuesta fisiológica al estrés involucra una comunicación eficiente entre diferentes sistemas que tienen como objetivo mantener la integridad fisiológica aún en las circunstancias más demandantes<sup>4</sup>. Entre estos sistemas podemos mencionar el sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo – hipófisis – adrenales (HHA).

El sistema nervioso autónomo proporciona la respuesta más inmediata tras la exposición al estresor a través de las vías simpáticas y parasimpáticas. El estresor induce alteraciones fisiológicas rápidas, por ejemplo, el incremento en el flujo

sanguíneo, el ritmo cardíaco y la excitabilidad del sistema cardiovascular<sup>4</sup>. El tronco cerebral recibe las señales de perturbaciones homeostáticas tales como disminución del flujo sanguíneo, dolor visceral inflamación, etc. La respuesta simpática a estas señales de daño involucra las acciones del arco reflejo que comunica regiones en la médula espinal (médula rostral ventrolateral) con neuronas preganglionares simpáticas. La respuesta parasimpática al estrés es mediada por el núcleo ambiguo y el núcleo motor dorsal del nervio vago, posicionado en el núcleo del tracto solitario<sup>4</sup>. La activación de estas vías tiene como resultado en la rápida secreción de adrenalina, noradrenalina y acetilcolina.

Por otra parte, el estrés activa al eje HHA. Tras la estimulación del núcleo paraventricular del hipotálamo induce la producción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de vasopresina. Estas hormonas son trasladadas por el sistema portal hacia la hipófisis, en donde estimulan la síntesis de proopiomelanocortina que, posteriormente, es procesada y convertida en corticotropina (ACTH). Finalmente, la ACTH estimula en la corteza adrenal la síntesis de glucocorticoides<sup>5</sup>.

La respuesta al estrés es compleja, y la producción de mediadores neuroendocrinos dependerá de la naturaleza, la intensidad y la duración del estresor. Los mediadores del estrés incluyen además de las hormonas y de los neurotransmisores clásicos (la adrenalina y los glucocorticoides) otros como los neuropéptidos (la sustancia P y la neurotensina), las citocinas, los factores de crecimiento y otros neurotransmisores (la acetilcolina, la serotonina y la dopamina)<sup>6</sup> que son producidos por terminales nerviosas o por las glándulas endocrinas.

Estos mediadores regulan la homeostasis del organismo, pero también pueden generar estados de enfermedad. Por lo tanto, es importante estudiar cómo los mediadores del estrés modulan las respuestas inflamatorias así como las implicaciones que estos mediadores pueden tener en el desarrollo, mantenimiento y resolución de diversos estados patológicos.

La activación del nervio vago es un fenómeno de importante regulación durante la respuesta al estrés. El estrés inducido por patógenos induce la secreción de acetilcolina del nervio vago. Tras una serie de eventos celulares, la acetilcolina actúa como un

centro de control anti-inflamatorio durante la sepsis<sup>7</sup>. Los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno han sido explorados solamente en algunos tipos celulares del sistema inmune como los macrófagos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el estrés agudo está involucrado en la activación del nervio vago que inhibe la respuesta inflamatoria inducida por la endotoxina en las células cebadas<sup>8</sup>.

## **2. Las células cebadas (CC)**

Las células cebadas se originan a partir de precursores hematopoyéticos en la médula ósea y casi no se encuentran en la circulación plasmática debido a que migran rápidamente a los tejidos. Las CC terminan su maduración en el tejido residente bajo la influencia del microambiente local y de diferentes factores de crecimiento como el stem cell factor (SCF)<sup>9</sup>, que mejora su capacidad de desgranulación y de producción de citocinas<sup>10</sup>. El SCF (ligando del receptor c-Kit) es el factor de crecimiento más importante para las CC. La presencia del receptor c-Kit sirve como marcador molecular para identificar a las CC al igual que la presencia del receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (FcεRI)<sup>11</sup>.

Otra característica importante de las células cebadas es la presencia de gránulos citoplasmáticos que almacenan de manera heterogénea mediadores preformados como la β-hexosaminidasa, la histamina, la serotonina y algunas citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), entre otros<sup>12</sup>.

Las respuestas de hipersensibilidad de tipo 1, o alergias, son desencadenadas por la activación del receptor FcεRI en las CC y son de los fenómenos más estudiados. Normalmente la inmunoglobulina E (IgE) producida por las células del sistema inmune, se une al FcεRI localizado en la membrana plasmática de las CC. Cuando la IgE detecta un antígeno (polen, venenos, etc) promueve el entrecruzamiento de los FcεRI activando una cascada de señalización intracelular que culmina con la secreción de los gránulos, fenómeno conocido como desgranulación anafiláctica<sup>13</sup>. Los mediadores secretados producen inflamación sistémica generando vasoconstricción y permeabilidad vascular. En conjunto, estas reacciones son características del shock anafiláctico y pertenecen a la inmunidad adaptativa. Sin embargo, las CC son capaces

de responder a otro tipo de estímulos e inducir respuestas inmunes innatas como aquéllas desencadenadas por la activación de los receptores tipo Toll (TLR).

### **2.1 Las CC en la inmunidad innata**

Las CC son efectoras en las respuestas de la inmunidad innata y cuentan con receptores reconocedores de patrones (RRP) que responden a múltiples señales de infección y daño. Algunos de los ligandos que activan a las CC son componentes de algunos microorganismos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), el ácido lipopoteico, los proteoglicanos y las flagelinas<sup>14</sup>. Este tipo de estímulos son conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Adicionalmente, las CC responden a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que son señales que se generan como consecuencia de la respuesta inflamatoria desencadenada por alguna infección o por daño al tejido, son ejemplo de DAMPs las proteínas de choque térmico (HSP), los componentes del complemento, el ATP, las proteínas de baja densidad (LDL), el colágeno, entre otros.

### **2.2 Activación del receptor tipo toll 4 (TLR-4) en las células cebadas**

El TLR-4 es un RRP que reconoce al LPS, componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas, aunque también reconoce otros ligandos como la LDL, las HSP y los proteoglicanos.

El LPS está formado por un lípido A, un núcleo de azúcares y un antígeno O. Una vez que entra al torrente sanguíneo, el LPS es capturado por la proteína LBP (LPS binding protein) y es capaz de activar al TLR-4 en complejo con el co-receptor CD14 y la proteína MD-2.

El estímulo con LPS genera la activación del receptor TLR-4 y la cascada de señalización subsecuente genera dos respuestas importantes, la primera es la activación de factores de transcripción encargados de la producción de citocinas proinflamatorias, y la segunda es la secreción de vesículas contenedoras de citocinas, una de ellas es el factor de necrosis tumoral (TNF) (ver figura 1).

### **2.3 Producción y secreción de TNF en CC estimuladas con LPS.**

El TNF es el mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda frente a las bacterias gram negativas. La principal función fisiológica del TNF es promover el reclutamiento de monocitos y neutrófilos a los focos de infección y activar a estas células para eliminar al microorganismo, de tal forma que su función es principalmente protectora<sup>15</sup>. En las CC se ha demostrado que el TNF se encuentra almacenado en vesículas que son secretadas bajo diversos estímulos incluyendo el de la IgE-antígenos<sup>16</sup> y el del LPS<sup>17</sup>. La secreción de TNF inducida por LPS es una herramienta que nos ayuda a estudiar la inmunidad innata dependiente del receptor TLR-4 en CC, de tal manera que dependiendo de los tiempos de estimulación podemos evaluar los fenómenos de secreción (durante las 2 primeras horas posteriores al estímulo) o los fenómenos de síntesis *de novo* de citocinas (después de las 2 horas de estimulación).

Evidencias recientes en estudios de nuestro laboratorio indican que tras la estimulación del receptor TLR-4 en BMMCs se induce un incremento en la fosforilación de IKK y ERK, moléculas clave en la vía canónica del TLR-4 que inducen la síntesis *de novo*; sin embargo, este incremento en la fosforilación también está directamente relacionado con el proceso de secreción temprana de TNF. Cuando en este estudio se empleó BAY11-7085, el inhibidor de IKK, la secreción temprana de TNF disminuyó. Lo mismo ocurrió cuando se utilizó PD98059 un inhibidor de MEK (MAPK cinasa que controla la fosforilación de ERK) que está río arriba de ERK. Estos resultados indican que la fosforilación de ERK e IKK promueve la secreción temprana de TNF estimulada por LPS<sup>17</sup>. Los mecanismos moleculares evaluados proponen que la activación de IKK promueve la fosforilación de VAMPs (proteínas membranales asociadas a vesículas) presentes en la membrana plasmática, como SNAP-23<sup>18</sup>, generando en el citoesqueleto los cambios necesarios para el proceso de secreción, pero el papel de la fosforilación de ERK en los mecanismos moleculares que favorecen la secreción temprana de TNF aún es desconocido.

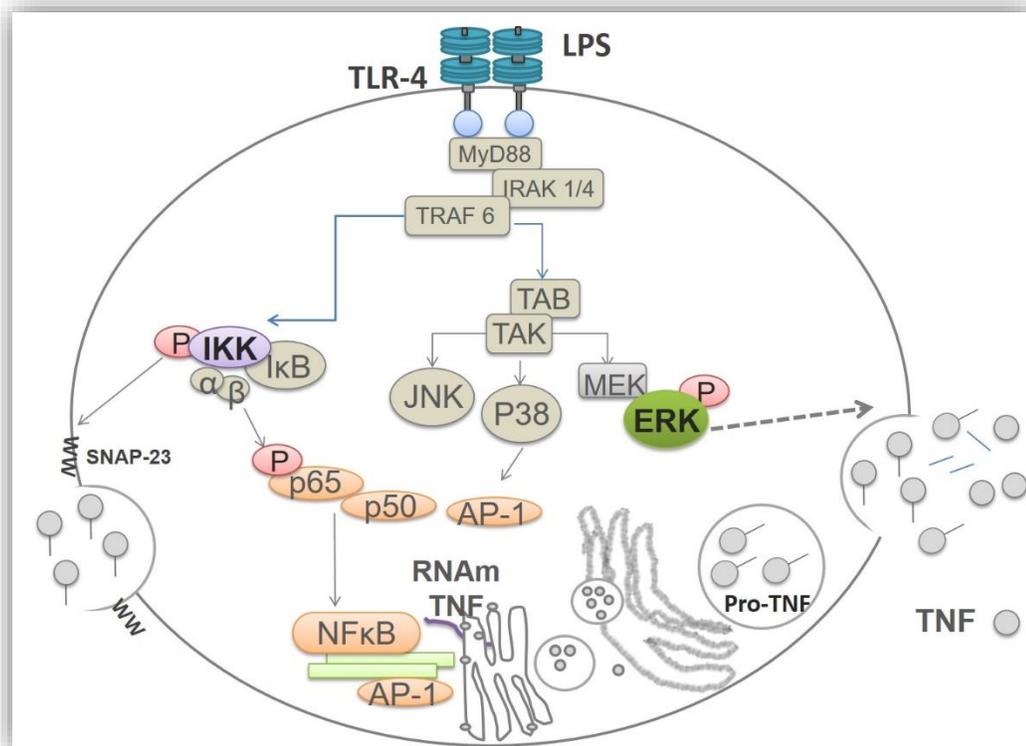


Figura 1. Sistema de señalización del TLR-4 en células cebadas. El lipopolisacárido bacteriano (LPS o endotoxina) es uno de los principales ligandos del TLR-4. La respuesta específica iniciada por el TLR-4 en las CC depende del reclutamiento de moléculas adaptadoras como MyD88. MyD88 se encarga de reclutar a IRAK, TRAF6 y el complejo TAK 1. En este punto la señal se divide e induce la activación de diversas MAP cinasas como ERK, JNK y P38, que llevan a la activación del factor de transcripción AP-1, y por otra parte activa a IKK $\alpha/\beta$  que tiene un papel crucial en la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B, IKK fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  que mantiene inactivo a NF $\kappa$ B. Esta fosforilación induce ubiquitinación y posteriormente es I $\kappa$ B $\alpha$  es degradado en el proteasoma. Cuando NF $\kappa$ B es liberado de I $\kappa$ B $\alpha$  induce la expresión de múltiples genes, generando la producción de los mediadores inflamatorios, como el TNF<sup>19</sup>.

## 2.4 Efecto de la activación del TLR-4 en modelos *in vivo*

Existen diversos modelos *in vivo* utilizados para estudiar la respuesta innata desencadenada tras la estimulación de los receptores TLR-4. Entre ellos, podemos mencionar la ligación y punción del ciego (CLP) que consiste en ligar una fracción del intestino y provocar la salida de bacterias perforándolo con una aguja estéril. Las bacterias invaden así toda la cavidad peritoneal generando sepsis acompañada de la producción de TNF, interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6), todas ellas citocinas pro inflamatorias<sup>20</sup>. Otros modelos consisten en inyectar directamente en la cavidad peritoneal bacterias completas o algunos fragmentos de ellas como el LPS<sup>21,22</sup>. Diferentes grupos de investigación han realizado estudios en los que mediante alguno de los modelos antes mencionados, generan sepsis en los ratones. Esos estudios indican que las células cebadas son las responsables de la producción de TNF durante las dos primeras horas tras la estimulación los receptores TLR-4<sup>23,24</sup>. Una de las maneras en las que estos grupos de investigación han asegurado este hecho ha sido utilizando el mismo modelo de sepsis, pero en ratones carentes de células cebadas ( $Kit^{WV}$ ,  $KIT^{Wsh/Wsh}$ ) y han observado que estos ratones no son capaces de producir TNF ante los mismos estímulos a los que fueron expuestos los ratones silvestres<sup>25</sup>, un ejemplo de estos experimentos se muestra en la figura 2.

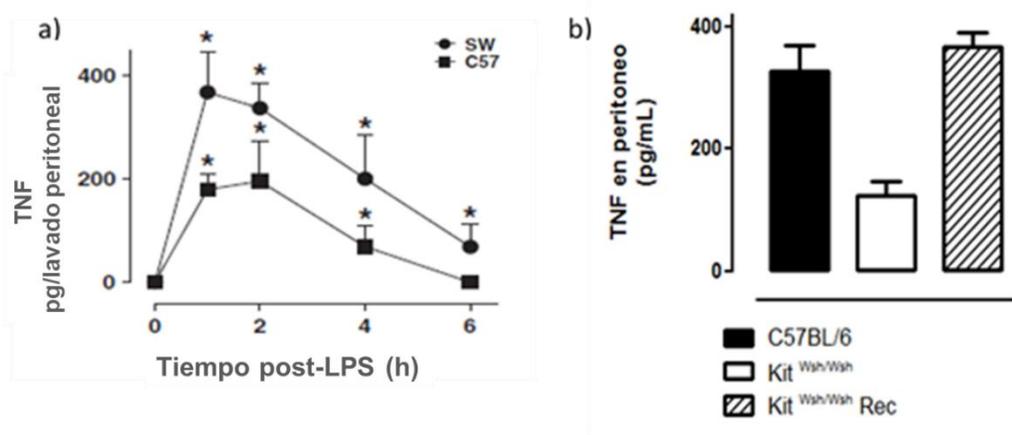


Figura 2. Niveles de TNF secretados por la administración i.p de LPS en ratones SW y C57BL/6J (panel A, tomado de Madera-Salcedo IK, 2013)<sup>26</sup>. Niveles de TNF en el peritoneo una hora después de ser estimulados con LPS, de ratones C57BL/6,  $Kit^{Wsh/Wsh}$  y  $Kit^{Wsh/Wsh}$  reconstituidos con BMBCs de ratones C57BL/6J (Panel B).

### 3. El estrés y sus efectos en las células cebadas

Las CC tienen en la membrana plasmática y el citoplasma muchos de los receptores para las hormonas y neurotransmisores que se secretan en respuesta al estrés. Muchos son los estudios que reportan cómo los mediadores del estrés modifican las respuestas inducidas por la activación del receptor FcεRI o la producción de algunos mediadores inflamatorios como la histamina, la β-hexosaminidasa o las prostaglandinas en las CC (tabla 1).

Tratamiento	Receptores activados	Efecto en las CC	Ref.
CRH y Neurotensina	CRH-R1 NT-R	↑ VEGF (células LAD1, HMC-1) inducidos por la activación del receptor FcεRI ↑ Histamina, β-Hexosaminidasa, VEGF ↑ respuesta de la IgE-Ag	27, 28, 29
Glucocorticoides (Dexametasona)	GC-R	↓ β-Hexosaminidasa, serotonina, Ca <sup>2+</sup> (células RBL-2H3, BMMC)	30, 31
Catecolaminas (Adrenalina, Isoproterenol, clenbuterol)	β- AR	↓ Histamina, leucotrienos inducida por la activación del receptor FcεRI	32,33, 34
Acetilcolina (GTS-21)	nAChRα7	↓ β-Hexosaminidasa	35
Estrés por inmovilización (30 min)- Ratones	—	Incrementa la desgranulación de las células cebadas intracraneales y de la piel.	36
Estrés por frío ( 4°C , 5 min)- Ratas	—	Incrementa la liberación de histamina, inducida por el ionóforo de calcio (A23187), de células cebadas aisladas de la piel.	32

Tabla 1.- Efecto de los mediadores del estrés en las respuestas inflamatorias mediadas por las CC.

Es importante mencionar que la mayoría de los estudios citados en la tabla 1 se han realizado con pre-incubaciones agudas (15 minutos a 1 h) con los mediadores del estrés y, cuando se trata de estudios *in vivo*, generalmente se utilizan modelos de estrés agudo. Los efectos del estrés agudo sobre las respuestas inmunes innatas dependientes de las

CC han sido poco explorados, y profundizaremos en ellos más adelante, pero indican que la acetilcolina producida por el nervio vago, en respuesta al estrés agudo, regula negativamente la secreción de mediadores inflamatorios estimulada por el LPS en este tipo celular<sup>8</sup>.

### **3.1 El nervio vago como modulador de la respuesta inmune innata dada por la activación del TLR-4**

La hipótesis de que la activación de los receptores nAChR en las CC tiene un efecto inhibitorio sobre la vía del receptor TLR-4 está respaldada por muchos estudios realizados en macrófagos y por un mecanismo conocido como reflejo antiinflamatorio colinérgico.

El reflejo antiinflamatorio colinérgico consiste en una cascada de eventos que comienzan en las aferentes del nervio vago. En estas terminales nerviosas existen receptores TLR (entre otros RRP) que al ser activados por estímulos inflamatorios transmiten la señal hacia las eferentes vagales que responden secretando acetilcolina en los alrededores del ganglio celiaco. Allí la acetilcolina promueve la liberación de vesículas contenedoras de catecolaminas (principalmente noradrenalina). La noradrenalina secretada se une a los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos de las células T, localizadas en la periferia del bazo, y éstas sintetizan acetilcolina que al liberarse activa a los nAChR $\alpha_7$  en los macrófagos (del bazo) y disminuye la producción de citocinas inflamatorias<sup>37,38</sup>. Así, el reflejo antiinflamatorio colinérgico es considerado un mecanismo que ayuda a frenar un proceso inflamatorio evitando efectos deletéreos al organismo (figura 3).

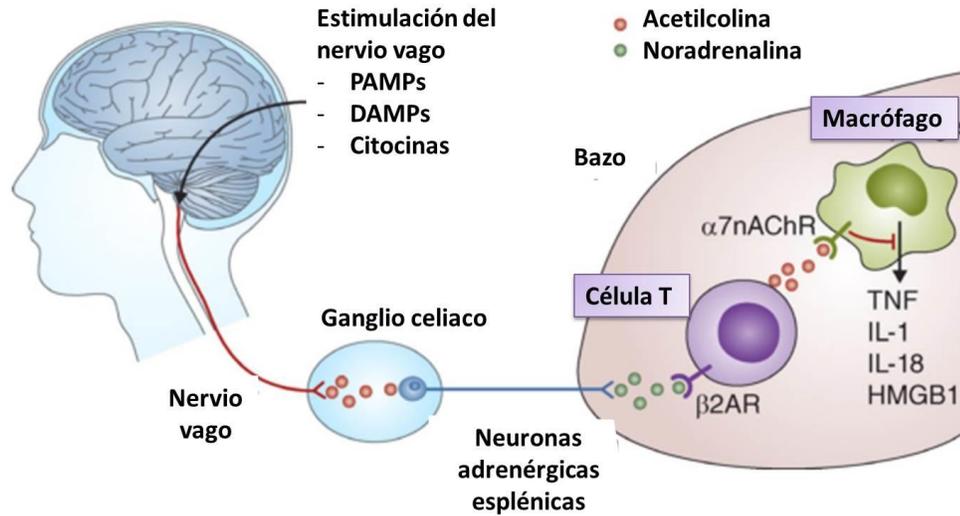


Figura 3. Representación esquemática del reflejo antiinflamatorio colinérgico. El nervio vago detecta estímulos inflamatorios e induce la secreción de acetilcolina en el ganglio celiaco. Allí, los mediadores inflamatorios, activan neuronas adrenérgicas que inducen la producción de acetilcolina en células T. La acetilcolina al activar a los nAChR $\alpha$ 7, evita que los macrófagos sigan produciendo citocinas pro-inflamatorias (tomado de la referencia Andersson, 2012)<sup>37</sup>.

Los mecanismos moleculares descritos para explicar cómo es que la activación del nAChR $\alpha$ 7 inhibe la vía de señalización del receptor TLR-4 están poco explorados, pero antes de hablar de los mecanismos propuestos, es necesario mencionar algunas generalidades respecto a composición y funcionalidad de los nAChR.

### 3.2 Moléculas participantes en el reflejo anti-inflamatorio colinérgico

Los receptores nicotínicos (nAChR) pertenecen a una súper familia de receptores iónicos activados por ligando, también conocidos como receptores cys-loop debido a que cada subunidad contiene en su dominio N-terminal pares de puentes disulfuro separados entre sí por 13 residuos de aminoácidos (figura 4a). A esta familia también pertenecen los receptores a glicina (GlyR), los receptores al ácido amino butírico tipo A (GABA<sub>A</sub>) y los receptores a serotonina tipo 3 (5HT<sub>3</sub>)<sup>39</sup>.

Los nAChR están compuestos por 5 subunidades (figura 4b) cada subunidad está conformada por tres dominios, un dominio extracelular de unión al ligando, cuatro

hélices transmembranales (M1-M4) y un dominio intracelular localizado entre las hélices M3 y M4, el cual tiene una gran longitud y su estructura primaria es muy variable dentro de la misma familia de receptores<sup>40</sup>. Hasta el momento se han descrito cinco clases de subunidades del nAChR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ), de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  existen diferentes isoformas (de la  $\alpha 2$  a la  $\alpha 10$ , y de la  $\beta 2$  a la  $\beta 4$ ). Estas subunidades se ensamblan de manera distinta formando receptores funcionales homopentaméricos o heteropentaméricos (figura 4c)<sup>41</sup>.

Las subunidades  $\alpha$  constituyen el principal sitio de unión al ligando, mientras que las subunidades adyacentes proporcionan el sitio complementario (figura 4c). El número de sitios de unión por pentámero difiere dependiendo de su composición, así los receptores heteropentaméricos (siempre con dos subunidades  $\alpha$  y las otras tres variables) tienen dos sitios de unión al ligando y los receptores homopentaméricos cinco sitios de unión<sup>42</sup>.

En la subunidad  $\alpha$  los pares de cisteínas que forman los puentes de disulfuro son los sitios de afinidad por el ligando ( $\alpha$  Cys-192 y  $\alpha$  Cys-193) y son características de todas las subunidades  $\alpha$  de los nAChR<sup>41</sup>. Los residuos aromáticos y los puentes de cisteína en el sitio de unión tienen una carga electronegativa, y se ha propuesto que la carga positiva que lleva la nicotina o los ligandos nicotínicos, todos ellos con grupos amonio cuaternario ( $\text{NH}_4^+$ ), puede ser neutralizada por estos residuos y favorecer la unión y afinidad al receptor<sup>41, 42</sup>.

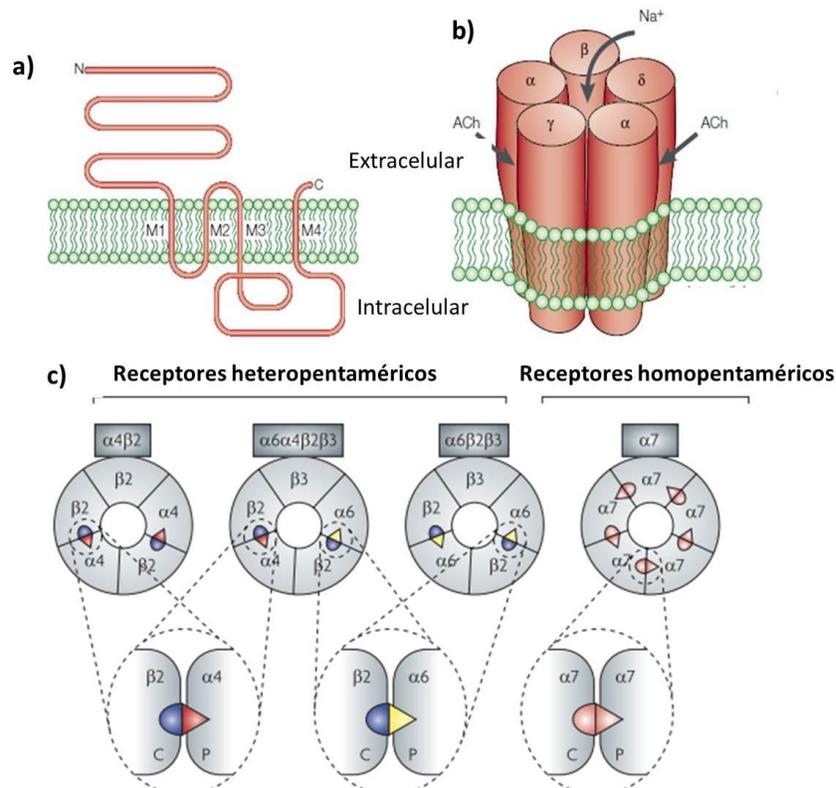


Figura 4. Características de los nAChR. a) Estructura cys-loop de una de las subunidades de los nAChR en donde se muestran los 4 dominios citoplasmáticos. b) Ensamble de 5 subunidades que forman un canal heteropentamérico. c) Representación de los sitios complementarios (c) y principales (p) para la unión del ligando cuando las subunidades se ensamblan en homopentámeros o heteropentámeros (Tomado de Karlin ,2002 y Taly, 2009)<sup>41,42</sup>.

### 3.3 Mecanismos de señalización de los nAChR.

La activación de los nAChR genera la apertura del poro que permite la entrada de cationes, principalmente Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. El poro del canal está compuesto por los segmentos  $\alpha$ - hélice de los dominios transmembranales M2 de cada subunidad. Juntos forman un anillo de residuos homólogos que permiten la permeabilidad iónica, además de ser el sitio de unión de los bloqueadores del canal. Los anillos de residuos cargados electronegativamente se encuentran en ambas extremidades del canal y contribuyen a la translocación catiónica a través de atracciones electrostáticas<sup>42</sup>.

La señalización de los receptores nAChR $\alpha$ 7 ha sido estudiada ampliamente en neuronas, en las que se sabe que la activación de estos receptores favorece el proceso de despolarización, por el incremento de calcio intracelular, provocando la liberación de algunos neurotransmisores. La fosforilación del dominio citoplasmático del receptor por cinasas de la familia de Src (como Fyn) modula el estado conformacional de la estructura del receptor y la actividad del canal. El nAChR $\alpha$ 7 puede interactuar físicamente con las proteínas PI3K, Fyn<sup>43</sup> y JAK-2<sup>38</sup>.

#### **4 Papel de los nAChR $\alpha$ 7 en las células del sistema inmune**

Los nAChR $\alpha$ 7 se expresan en muchas células del sistema inmunológico como los macrófagos, los monocitos, la microglía, las células T y las CC.

Los modelos *in vitro* indican que en los macrófagos la acetilcolina, la nicotina y la muscarina evitan la producción de TNF, IL-1e IL-6<sup>44-47</sup> inducida por LPS. El mismo efecto ha sido reportado en cultivos de microglía. Los modelos animales han demostrado que cuando se estimula eléctricamente el nervio vago los niveles séricos de TNF se ven disminuidos en ratones tratados previamente con LPS<sup>44</sup>.

La participación específica de los nAChR $\alpha$ 7 también se ha demostrado en experimentos con macrófagos del bazo derivados de ratones carentes de la subunidad  $\alpha$ 7 del nAChR. En estas células, la colina (agonista nicotínico) no inhibe la producción de TNF inducida por LPS<sup>48</sup>.

A pesar de que se conoce el papel antiinflamatorio que la activación de los nAChR $\alpha$ 7 tiene sobre la respuesta inmune innata, desencadenada por la estimulación del receptor TLR-4, los mecanismos moleculares asociados a las vías de señalización que convergen en ambos receptores están poco explorados.

##### **4.1 Vía de señalización involucrada en la inhibición de la secreción de mediadores inflamatorios estimulada por el receptor nAChR $\alpha$ 7.**

La caracterización de los mecanismos moleculares que subyacen al reflejo antiinflamatorio colinérgico, en distintos tipos celulares, contribuye a la investigación

básica para el desarrollo de tratamientos farmacológicos con blancos moleculares específicos para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias.

Se han realizado pocos estudios con el fin de identificar a las proteínas responsables de la inhibición de la producción de citocinas después del tratamiento con GTS-21 un agonista específico para la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR $\alpha 7$ . Los estudios más importantes son los siguientes:

En monocitos y macrófagos, la activación de nAChR $\alpha 7$  por agonistas selectivos (colina, nicotina, GTS-21) inhibe la producción de TNF; además, se ha reportado una disminución en la fosforilación de IKK y una disminución en la actividad del factor de transcripción NF $\kappa$ B. Por otra parte, la unión de JAK-2 al nAChR $\alpha 7$  inicia un mecanismo de transducción mediado por la proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción (STAT)-3. Esta vía regula negativamente a NF $\kappa$ B evitando su unión al DNA, además STAT3 incrementa la transcripción de la proteína SOCS-2 (supresor de la señalización de citocinas)<sup>38</sup>.

En una línea de macrófagos inmortalizados (células RAW 264), la pre-incubación durante 2h con GTS-21 inhibió la producción de TNF, IL-1 e IL-6, 22h después de la estimulación con LPS. Además, el GTS-21 inhibió la fosforilación de IKK, de AKT, y de P65 (subunidad de NF $\kappa$ B), este último evento fue revertido con el uso de la  $\alpha$ -Bungarotoxina (antagonista específico nAChR $\alpha 7$ )<sup>49</sup>.

En otro estudio realizado en células mononucleares periféricas estimuladas durante 22 horas con LPS, el GTS-21 y la nicotina inhibieron la producción de TNF, IL-1 e IL-6. En este caso, un inhibidor de Jak-2 (AG490) previno el efecto inhibitor del GTS-21 sobre la producción de TNF<sup>45</sup>. La secreción de otros mediadores inflamatorios es controlada por el reflejo antiinflamatorio colinérgico. Se ha reportados que el pretratamiento con GTS-21 previene el daño renal generado durante la sepsis, disminuyendo la infiltración de células mononucleares a los riñones a través de la disminución en la producción de agentes quimioatrayentes como CCL2<sup>50</sup>. El efecto que los receptores nAChR $\alpha 7$  tienen sobre la inhibición de CCL2 también han sido atribuidos a la cinasa JAK-2<sup>51,52</sup>. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado el papel que otras cinasas asociadas al receptor nicotínico, como las cinasas Fyn y Lyn,

puedan ejercer sobre la vía de señalización del receptor TLR-4 que controla la síntesis y secreción de mediadores inflamatorios.

Finalmente, aunque en CC se ha reportado la expresión de los nAChR $\alpha$ <sup>735</sup> los efectos de su activación sobre la vía del receptor TLR-4 han sido poco explorados. En nuestro departamento se han realizado algunas aproximaciones que se describen a continuación.

Utilizando ratones C57BL/6J que fueron sometidos por 15 minutos al modelo de nado forzado se demostró que este tipo de estrés inhibe la secreción peritoneal de TNF, 1h después del estímulo con LPS. En este estudio se realizaron diversas aproximaciones farmacológicas para saber qué hormona o neurotransmisor secretado en respuesta al estrés era el que inducía el efecto inhibitor. Entre las estrategias utilizadas se administró a los ratones un antagonista nicotínico (mecamilamina) antes de someterlos al nado forzado. En este estudio se encontró que la mecamilamina previno el efecto inhibitor que el nado forzado tenía sobre la secreción de TNF inducida por LPS en las células cebadas de la cavidad peritoneal<sup>8</sup>.

De esta manera se puede inferir que la acetilcolina que se secreta durante la respuesta al estrés agudo actúa sobre los receptores nicotínicos presentes en las células cebadas de la cavidad peritoneal y evita la secreción de TNF inducida por el LPS.

## JUSTIFICACIÓN

El estrés es una condición fisiológica en la que el organismo genera la producción de mediadores neuroendocrinos, los cuales, afectan la respuesta inflamatoria dada por la activación del sistema inmunológico.

Las células cebadas son importantes moduladores de la inmunidad innata y adaptativa, su activación desencadena respuestas inflamatorias relevantes en distintas condiciones fisiopatológicas. A pesar de que los efectos del estrés agudo han sido ampliamente explorados en la respuesta inmune adaptativa desencadenada por las CC, poco se conoce sobre el papel que los mediadores del estrés tienen sobre la respuesta inmune innata, mediada por la activación del receptor TLR en este tipo celular. Algunos antecedentes de nuestro grupo de investigación indican que la activación del reflejo anti-inflamatorio colinérgico, en respuesta al estrés agudo, tiene efectos inhibidores en la secreción de TNF inducida por LPS en las CC de la cavidad peritoneal. Por este motivo, fue de nuestro interés evaluar los mecanismos moleculares mediante los que la activación de los nAChR $\alpha$ 7, en las CC, regula negativamente la vía de señalización del receptor TLR-4 que conducen a la secreción temprana de mediadores inflamatorios.

Adicionalmente, existe evidencia clara de que los mediadores producidos durante el estrés agudo regulan negativamente las respuestas inmunes adaptativas en las CC. No obstante, hasta el momento se desconoce el papel que el estrés crónico, condición a la que los habitantes de las grandes urbes están expuestos constantemente, tiene sobre la respuesta inmune innata mediada por la activación del receptor TLR-4 en las CC. Por esta razón, decidimos evaluar los efectos del estrés crónico sobre dicha respuesta.

En general, el propósito de esta tesis fue evaluar, de manera independiente, los efectos que el estrés (agudo por la activación de la vía antiinflamatoria colinérgica y crónico) ejerce sobre los mecanismos de secreción de TNF inducida por el LPS en las CC, *in vitro* e *in vivo*.

## **HIPÓTESIS**

I.- La activación de los nAChR $\alpha$ 7 inhibirá la secreción de TNF en células cebadas estimuladas con LPS, *in vivo* e *in vitro*.

II.- El estrés crónico modificará la secreción de TNF inducida por LPS en las células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones SW.

## **OBJETIVOS GENERALES**

I.- Evaluar el efecto de la activación de los nAChR $\alpha$ 7 en la secreción de TNF inducida por LPS en las células cebadas.

II.- Determinar si el estrés crónico modifica la secreción de TNF inducida por LPS en las células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones SW.

## **PRIMERA SECCIÓN**

### **Objetivo general**

I.- Evaluar el efecto de la activación de los nAChR $\alpha$ 7 en la secreción de TNF inducida por LPS en BMMCs.

### **Objetivos particulares**

- a) Evaluar los efectos de un agonista para los receptores nAChR $\alpha$ 7, GTS-21, sobre la secreción de TNF en un modelo murino de endotoxemia por LPS.
- b) Evaluar la expresión y funcionalidad de los receptores nicotínicos en BMMCs
- c) Evaluar si el GTS-21 inhibe la secreción de TNF en BMMCs estimuladas con LPS.
- d) Evaluar el efecto del GTS-21 sobre la activación de las moléculas involucradas en la síntesis y secreción de TNF en la vía de señalización del TLR-4.
- e) Identificar las moléculas y procesos mediante los cuales el GTS-21 inhibe la vía de señalización del TLR-4.

## Material y métodos

Animales. Para los experimentos *in vitro* se utilizaron las siguientes cepas de ratones. Ratones C57BL/6J (número de serie 000664), ratones Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> deficientes en células cebadas (número de serie 005051), ratones Fyn - knock - out (número de serie 002271) y ratones knock - out de Lyn (Número de serie 003204) del Jackson Laboratory (Maine, EE.UU.). Los animales se mantuvieron en instalaciones adecuadas, con temperatura controlada (22-24 ° C), bajo condiciones invertidas del ciclo de luz/oscuridad (12:12 h, encendido a las 22:00 horas) y con libre acceso a alimento y agua. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la norma oficial mexicana para el cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999) y fueron aprobados por nuestro Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, protocolos No. 074-13 y 0137-13).

Para los experimentos *in vivo* se trabajó con dos cepas de ratones machos, de 12 semanas de edad C57BL/6 y Kit<sup>Wsh/Wsh</sup>. Los ratones Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> tienen una mutación en el gen que codifica para el receptor c-kit, cuyo ligando es el SCF (factor de crecimiento determinante para la sobrevivencia de las células cebadas) de tal manera que los ratones, al cumplir las 8 semanas de edad carecen de este tipo celular<sup>53</sup>. Los animales fueron mantenidos en condiciones normales del ciclo de luz/oscuridad, a temperatura controlada (22° C-24° C) y con libre acceso a agua y alimento.

Reconstitución.- Ratones Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> de 8 semanas de edad fueron reconstituidos por vía intraperitoneal con  $2 \times 10^6$  de células cebadas derivadas de médula ósea (BMDCs) provenientes de ratones C57BL/6J. Cuatro semanas después de la reconstitución los animales estaban listos para recibir el reto con endotoxina<sup>54</sup>.

Lavados peritoneales y cuantificación de TNF *in vivo*.- Utilizamos lavados peritoneales para la determinación de TNF Los ratones se inyectaron (i.p) con GTS-21 (0.25 mg/kg) 30 minutos antes de la administración i.p de LPS (1 mg / ml). Una hora después del reto con LPS, los animales fueron sacrificados y se realizaron lavados peritoneales

mediante la inyección de 2 ml de solución salina estéril en la cavidad peritoneal. La inyección fue seguida por un masaje suave en la cavidad peritoneal, la solución salina (aproximadamente 1 mL) fue recuperada con una jeringa estéril después de exponer el peritoneo. Los lavados peritoneales se centrifugaron a 10500 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes, libres de células, se mantuvieron a -70° C para la posterior cuantificación de TNF utilizando un kit de ELISA específico siguiendo las instrucciones del proveedor (PreproTech, 900 - K126).

Cultivo celular.- Se extrajo la médula ósea de las tibias de ratones C57BL/6J y se cultivó en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), suplementado con FBS 10%, estreptomicina 100 mg/mL, penicilina 100 UI / mL, HEPES 25 mM, aminoácidos no esenciales (NEAA) 0.1 mM, antibiótico y antimicótico 1X, IL-3 20 ng/mL y SCF 10 ng/mL, condiciones utilizadas en estudios previos del laboratorio<sup>17</sup>. La pureza de los cultivos se evaluó rutinariamente mediante citometría de flujo para detectar la presencia del receptor FcεRI en la membrana plasmática. Sólo se utilizaron cultivos que mostraron más del 98% de células FcεR1 positivas. Todos los experimentos se realizaron con cultivos de 6 semanas de edad y las BMMCs se sensibilizaron con IgE anti-DNP 100 ng/mL (clon SPE7, Sigma-Aldrich) 24 horas antes de los tratamientos con el objetivo de promover la maduración del cultivo<sup>55</sup>.

Agentes farmacológicos.-La nicotina, el GTS-21 (diclorhidrato de 3-(2,4-dimetoxibencilden) -anabasina), el AG490 (Tyrphostin), la Actinomicina D, el BAY117085 y el LPS (serotipo 026: B6) fueron adquiridos en Sigma Aldrich. El PD98059 y el BAPTA se adquirieron de Calbiochem y el TAPI-1 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology. El PHA543613 fue adquirido de Tocris, y el Tropisetron (Sandoz Pharma) fue generosamente donado por el Dr. Alfredo Meneses. El GTS-21, el PHA543613 LPS se disolvieron en agua; el AG490, el TAPI-1, el BAY117085 y el BAPTA se reconstituyeron en DMSO y se diluyeron de tal forma que en los experimentos la cantidad de DMSO no pasara de más del 0.1%. El PD98059 se reconstituyó con metanol y la concentración final de metanol en las células se mantuvo

por debajo del 1%. Las concentraciones utilizadas de los agentes farmacológicos se especifican en la tabla 2.

Los anticuerpos contra TNF, p-ERK 1/2 (Tyr 204) y  $\beta$ -actina fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos contra p-p65 (Ser 536) y p-IKK (Ser 176/180) fueron de Cell Signaling, el anticuerpo anti-TACE fue adquirido de Abcam. Para el western blot, los anticuerpos secundarios (anti-ratón y anti-conejo) fueron de Jackson ImmunoResearch. El anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 y DAPI para microscopía confocal fue de Thermo Fisher.

Mediciones de la secreción de TNF y CCL-2 por la técnica de ELISA.- Para la medición de los mediadores inflamatorios se usaron BMDCs en medio RPMI, se centrifugaron a 10500 x g durante 5 min y se re-suspendieron en medio nuevo, a una densidad final de dos millones de células/mL. Después de los pre-tratamientos y la estimulación, indicados en el diseño experimental, las células fueron colectadas y centrifugadas. Los sobrenadantes se mantuvieron a  $-80^{\circ}$  para la evaluación de TNF y CCL-2 usando el kit de ELISA específico para citocinas (PreproTech, 900 - K59 para TNF y PreproTech, 900-K126 para CCL-2) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Evaluación de la fosforilación de proteínas mediante western blot. Las BMDC ( $2 \times 10^6$ ) fueron pre-tratadas y estimuladas como se describe en el diseño experimental. Después de los tratamientos, las células se lisaron con buffer Laemmli 2X, suplementado con orto-vanadato de sodio 4 mM y 2-mercaptoetanol 0.28 mM. Los lisados celulares se hirvieron durante 15 minutos, y se mantuvieron a  $-80^{\circ}$  hasta su uso. Las muestras (35  $\mu$ L) se separaron por SDS-PAGE estándar y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon con leche sin grasa al 4% y se incubaron durante toda la noche con anticuerpos primarios a una dilución de 1:1000, en buffer TBS-T (Tris 25 mM, NaCl al 0.9%, Tween-20 al 0.05%). Los anticuerpos primarios se retiraron y las membranas se lavaron tres veces con TBS-T

antes de ser incubadas en presencia de los respectivos anticuerpos secundarios (dilución 1:20,000). Las membranas se lavaron de nuevo tres veces con TBS-T y las bandas de proteína se detectaron utilizando un sustrato de HRP quimioluminiscente (Millipore). Se realizó el revelado con películas fotográficas (Kodak #) y se realizó el análisis densitométrico utilizando el software LabWorks 4.5.

Inmunofluorescencia para la detección de las subunidades del nAChR.- Después de los pre-tratamientos y la estimulación, los BMNC fueron colectadas y se re-suspendieron en 300  $\mu$ L de PBS 1X (buffer de fosfato 0.1 M, cloruro de potasio 0.027 M y cloruro sódico 0.137 M). Las células se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio y se dejaron secar durante 30 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, las células se fijaron con paraformaldehído (4%) por 15 minutos, se bloquearon durante dos horas (1% de BSA, 5% de suero de burro inactivado y 0.1% de Tween 20) y se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios anti-TNF (dilución 1: 500). Los anticuerpos primarios se lavaron con PBS-Tween (0.1%) (diez veces, 1 min cada vez), y luego las células se incubaron durante 2 horas con el Alexa Fluor 488 burro anti cabra IgG (anticuerpo secundario diluido 1: 500). Finalmente, se montaron los portaobjetos con glicerol y se incubaron 5 min con DAPI (dilución 1:500) para teñir los núcleos celulares. Los valores de fluorescencia se evaluaron con un microscopio confocal (Carl-Zeiss LSM-800) y se utilizó el software Zen lite V 2.4 para la adquisición de imágenes.

Detección del RNAm para nAChR $\alpha$ 7.- El RNA total se extrajo de dos millones de células utilizando el reactivo TRI (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó DNAc utilizando el sistema de síntesis de primera cadena Superscript (Life Technologies). Se utilizaron los siguientes primers para la amplificación de TNF 5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3' (sentido) y 5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3' (antisentido) y GAPDH (sentido) 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3' y 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC - 3 (antisentido). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa (2%) teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes fueron

generadas con un Epichemi Darkroom de UVP Systems y el análisis densitométrico se realizó utilizando el software LabWorks 4.5.

Mediciones de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  por espectrofluorimetría.- Se utilizaron  $10 \times 10^6$  BMMCs para cada estímulo. Las células fueron incubadas con FURA 2-AM ( $5 \mu\text{M}$ ) durante 1 hora en buffer Tyrode a  $37^\circ \text{C}$ . Al terminar la incubación las células fueron lavadas con buffer Tyrode y se colocaron en las celdas a  $37^\circ \text{C}$  en donde se aplicaron los estímulos con GTS-21 ( $100 \mu\text{M}$ ) o con DNP-antígeno ( $27 \text{ ng/mL}$ ) utilizado como control positivo de acuerdo a estudios previos de laboratorio<sup>55</sup>.

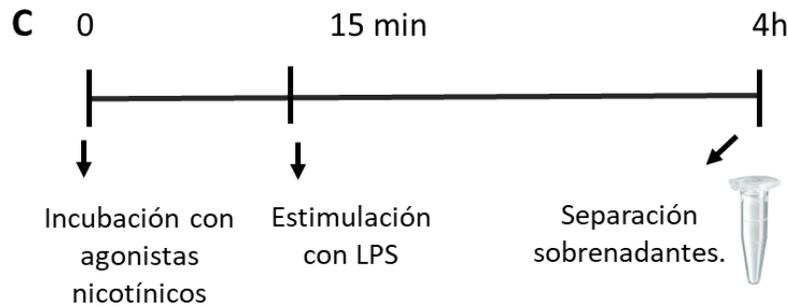
Estadística.-Con la finalidad de determinar diferencias entre los tratamientos de un mismo grupo, los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett para las comparaciones múltiples. Para determinar la diferencia entre tratamientos de grupos distintos se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Dunnett. En todos los casos se consideró una diferencia significativa con un valor de  $*P \leq 0.05$ .

<b>Nombre</b>	<b>Función</b>	<b>Concentración utilizada</b>
LPS	Agonista del TRL-4	500 ng/mL
DNP-HSA	Agonista del receptor FcεRI	1, 3, 9, 27, 81 y 273 ng/mL
Fura 2AM	Sensor de calcio	50 mM
GTS-21	Agonista del nAChRα7	100 μM
Nicotina	Agonista nAChR	1 nM- 1mM
Tropisetron	Agonista del nAChRα7	1, 10 y 100 μM
PHA543613	Agonista del nAChRα7	1, 10 y 100 μM
Actinomicina D	Inhibidor de la transcripción	5 μM
BAY117085	Inhibidor de IκBα	2 μM
PD98059	Inhibidor de MEK 1/2	5 μM
AG490	Inhibidor de Jak-2	10 nM
BAPTA	Quelante de calcio	2 μM
TAPI *(pre-incubaciones durante 3 horas)	Inhibidor de TACE	50 μM

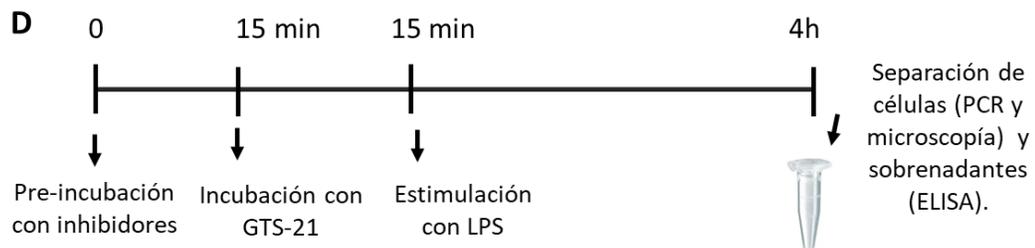
Tabla 2. Listado de agonistas e inhibidores utilizados para la estimulación de BMMCs.



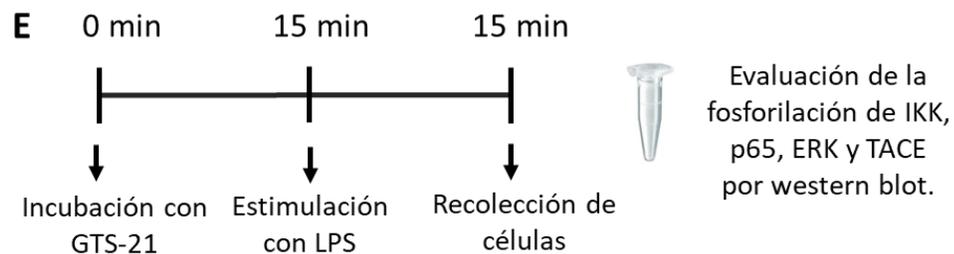
**Caracterización de los efectos de la activación de los nAChR $\alpha$ 7 sobre la secreción de TNF inducida por LPS *in vitro*.** Para las mediciones de TNF en los sobrenadantes celulares las BMBCs fueron estimuladas de acuerdo a lo indicado en el esquema C.



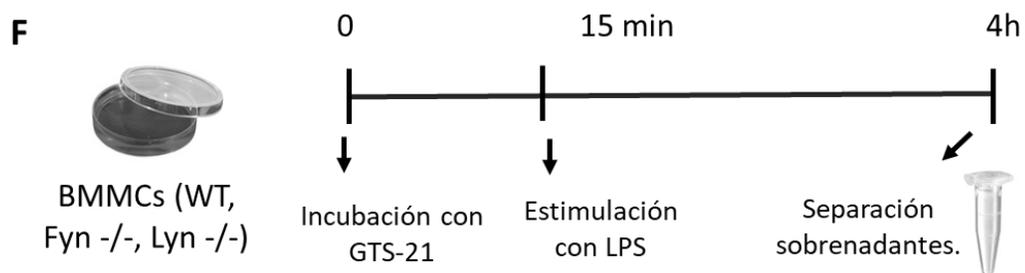
**Caracterización de los efectos inhibidores del GTS-21 sobre los mecanismos implicados en la secreción de TNF en la vía de señalización del receptor TLR-4, *in vitro*.** Para realizar la caracterización de los mecanismos implicados (síntesis *de novo* o secreción temprana) se midió la acumulación del RNAm del TNF mediante la técnica de PCR, la acumulación citoplasmática de TNF mediante microscopía confocal y la secreción de TNF y CCL-2 (utilizando los inhibidores de ERK e IKK) en los sobrenadantes celulares mediante la técnica de ELISA de acuerdo a lo indicado en el esquema D.



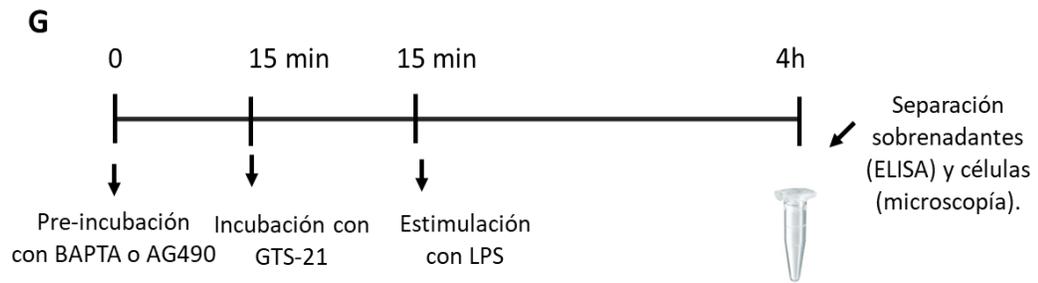
**Caracterización de los efectos inhibidores del GTS-21 sobre las moléculas implicadas en la secreción de TNF en la vía de señalización del receptor TLR-4, *in vitro*.** Para cumplir este objetivo se evaluó la fosforilación, mediante western blot, de algunas moléculas implicadas en la vía de señalización del TLR-4 después del tratamiento con GTS-21 y LPS de acuerdo a lo indicado en el esquema E.



**Caracterización de las moléculas y los mecanismos responsables del efecto inhibitor de la activación del nAchR $\alpha$ 7 sobre la vía de señalización del receptor TLR-4, *in vitro*.** Para evaluar las moléculas involucradas se utilizaron BMBCs de ratones WT, Fyn<sup>-/-</sup> y Lyn<sup>-/-</sup> (moléculas asociada al receptor nAchR $\alpha$ 7) en las cuales se midió el TNF secretado en los sobrenadantes después del tratamiento con GTS-21 y LPS (esquema F).



También se utilizó un agente quelante de calcio (BAPTA) y un inhibidor de la cinasa JAK-2 (AG490) en BMBCs tratadas con GTS-21 y LPS en las cuales se midió el TNF secretado en los sobrenadantes o la acumulación citoplasmática de esta citocina respectivamente (esquema G).



Finalmente para evaluar el efecto del AG490 sobre la fosforilación de ERK y de P65 se siguió el tratamiento mostrado en el esquema H.



## Resultados

**1.- Evaluación de los efectos del GTS-21 en la secreción de TNF inducida por LPS *in vivo*.** Los antecedentes experimentales indicaban la participación de los receptores nicotínicos en la inhibición producida por un estresor agudo en la secreción de TNF inducida por LPS (dependiente de las células cebadas de la cavidad peritoneal de los ratones SW y C56BL/6J). Nosotros decidimos evaluar si este efecto era específico del nAChR homopentamérico para las subunidades  $\alpha 7$  del para lo cual tratamos con GTS-21 a ratones C57BL/6J y evaluamos la secreción de TNF una hora después del reto con endotoxina. Para el experimento se utilizaron diferentes dosis de GTS-21 (4 mg/kg, 1 mg/kg, 0.5 mg/kg y 0.25 mg/kg) y solo la dosis de 0.25 mg/kg logró reducir la secreción de TNF inducida por LPS (de  $425 \pm 11$  pg/mL a  $271 \pm 32$  pg/ mL). Los resultados se observan en la barra de rayas de la figura 5.

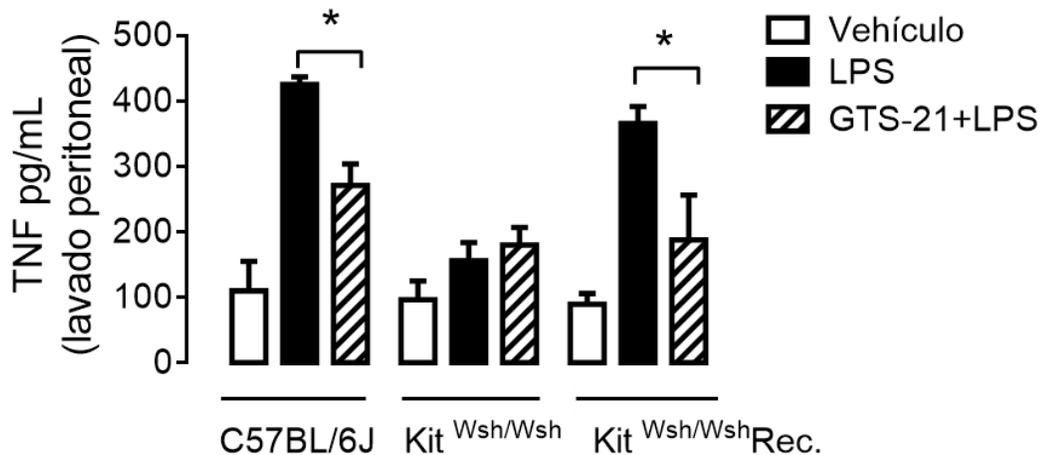


Figura 5. Efectos de la administración de 0.25 mg/kg de GTS-21 sobre la secreción peritoneal de TNF en respuesta a LPS. Ratones C57BL/6J, Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> y Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> reconstituidos. Prueba de Dunnett \*P<0.05, n=4.

**2.- Expresión de diferentes subunidades del receptor nicotínico en las células cebadas.** Dado que la activación de los receptores nAChR $\alpha$ 7 participa inhibiendo las respuestas inflamatorias dependientes de las células cebadas *in vivo*, decidimos caracterizar sus blancos moleculares en la vía de señalización del receptor TLR-4 en un modelo *in vitro*, utilizando células cebadas derivadas de médula ósea (BMMCs). Antes de evaluar los efectos de la activación de los receptores nicotínicos sobre la secreción de TNF en las células cebadas decidimos evaluar si las BMMCs cultivadas en el laboratorio expresaban estos receptores. Para ello se extrajo el RNA total y se realizó una PCR con oligonucleótidos para 5 diferentes subunidades  $\alpha$ 2,  $\beta$ 4,  $\alpha$ 4,  $\beta$ 2 y  $\alpha$ 7. Como se observa en la figura 6, las BMMCs expresan las cinco subunidades analizadas que amplificaron alrededor de los 400 pb.

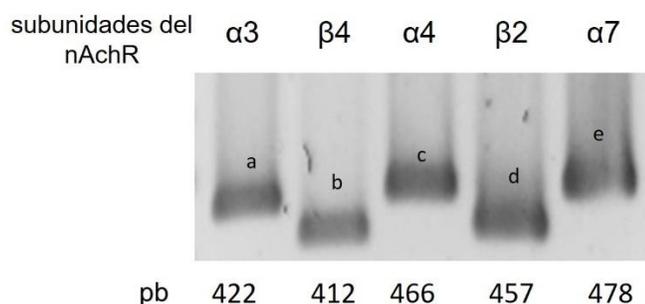


Figura 6. Presencia de las distintas subunidades del receptor nicotínico en BMMCs. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

### 3.- La activación del nAChR $\alpha$ 7 con GTS-21 genera movilización de calcio intracelular sin promover la desgranulación de $\beta$ -hexosaminidasa.

Después de identificar la expresión de la subunidad  $\alpha$ 7 del receptor nicotínico en las BMMCs fue necesario evaluar si estas subunidades eran capaces de ensamblarse y formar un receptor homopentamérico funcional. Por esta razón evaluamos la movilización de calcio intracelular en BMMCs después de ser estimuladas con GTS-21. La estimulación con GTS-21 genera un incremento inmediato en el calcio intracelular que regresa a sus niveles basales rápidamente (figura 7A) comparado con la movilización de calcio inducida por el antígeno, usado como control positivo, en donde el incremento de calcio es más lento y sostenido (figura 7B).

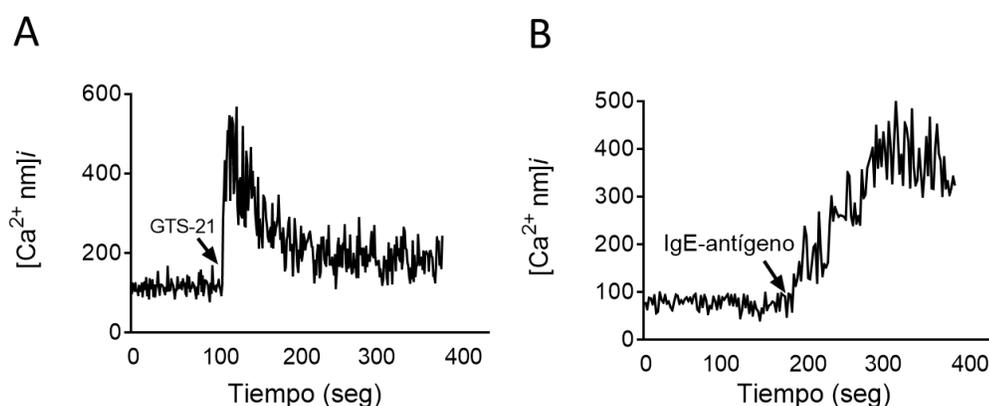


Figura 7. Funcionalidad de los receptores nAChR $\alpha$ 7 en BMMCs. Trazos de calcio generados por la estimulación de BMMCs con GTS-21 (100  $\mu$ M) en el panel A o con IgE-antígeno (27 ng/mL) en el panel B. Imagen representativa de 4 experimentos independientes.

Dado que la estimulación del nAChR $\alpha$ 7 en BMMCs indujo un incremento intracelular de calcio se decidió evaluar si este calcio promovía el proceso de desgranulación anafiláctica. Para ello, se midió la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa en BMMCs estimuladas con GTS-21. Como se observa en la figura 8A, el control positivo (IgE-antígeno) incrementa la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa y el GTS-21 no tiene, por sí solo, ningún efecto sobre la liberación de esta enzima (ANOVA de una vía  $F_{(2,14)} = 59.22$ ,  $P < 0.00$ ). Sin embargo, como se observa en el panel B de la figura 8, el GTS-21 si es capaz de inhibir la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa inducida por IgE- antígeno (ANOVA de dos vías  $F_{(28,41)} = 35$ ,  $P < 0.001$ ).

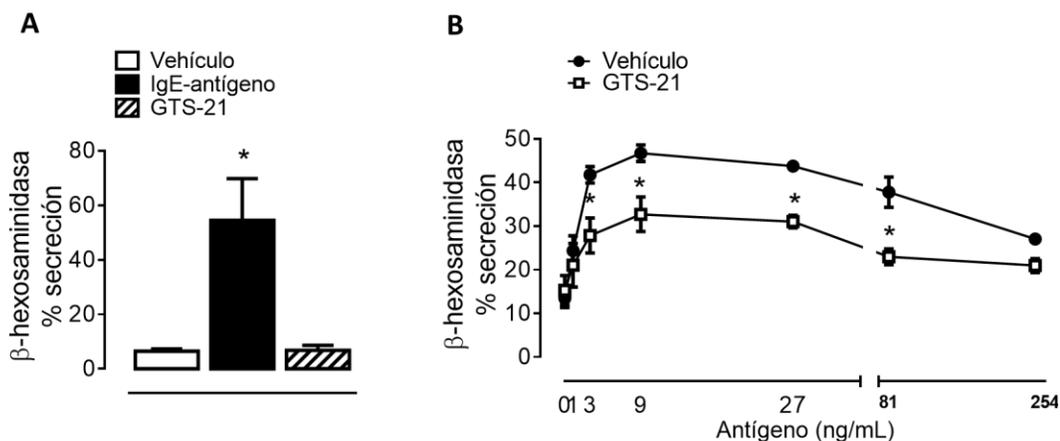


Figura 8. El GTS-21 no estimula la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa. Panel A, concentraciones de  $\beta$ -hexosaminidasa en BMMCs estimuladas con IgE-antígeno (27 ng/mL) o con GTS-21 (100  $\mu$ M),  $n=6$ . Prueba de Dunnett \* $P < 0.05$  vs el vehículo. Panel B, niveles de  $\beta$ -hexosaminidasa en BMMCs pre-incubadas con GTS-21 (100  $\mu$ M) y con diferentes concentraciones de IgE-antígeno,  $n=3$ . Prueba de Dunnett \* $P < 0.05$  vs el vehículo a la misma concentración.

#### 4.- Los agonistas nicotínicos inhiben la secreción de TNF inducida por LPS en BMMCs.

Para averiguar si la activación de los receptores nicotínicos tenía algún efecto sobre la secreción de TNF inducida por LPS en BMMCs, las células se pre incubaron con un agonista nicotínico inespecífico (nicotina) o con tres diferentes agonistas específicos para la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR (GTS-2, tropisetron y PHA543613) en concentraciones desde 1 nM a 100  $\mu$ M y se estimularon durante 4h con LPS, y se evaluó la secreción de TNF en los sobrenadantes celulares. En las figuras 9 se observa la inhibición que los agonistas nicotínicos producen sobre la secreción de TNF inducida por LPS, la nicotina a una concentración de 10 mM y el GTS-21, el tropisetron y el PHA543613 a la concentración de 100  $\mu$ M (paneles B,C y D).

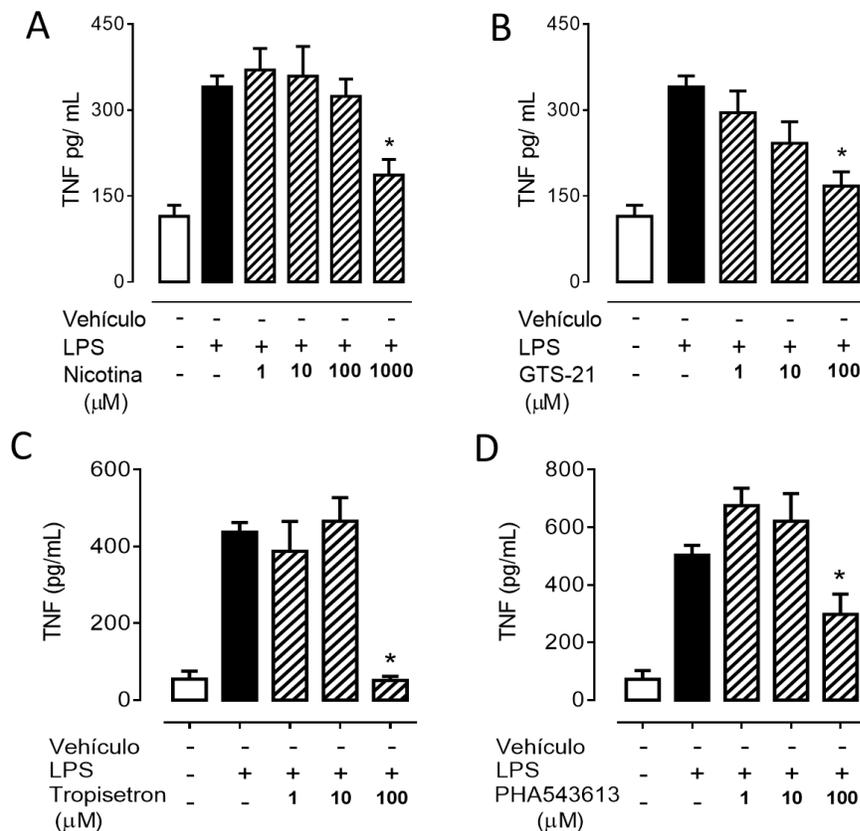


Figura 9. Los agonistas nicotínicos inhiben la secreción de TNF inducida por LPS en BMMCs. Concentraciones de TNF en los sobrenadantes de BMMCs pre-incubadas con nicotina (panel A), GTS-21 (panel B), tropisetron (panel C) o PHA54361 (panel D), n=4, \*P<0.05.

En las células cebadas el TNF que se secreta en respuesta al LPS puede provenir de dos fuentes distintas, ya sea de los gránulos citoplasmáticos contenedores de TNF preformado, o del TNF que está siendo sintetizado *de novo*. Para averiguar en qué momento ocurre cada uno de estos eventos, utilizamos actinomicina D (Act D), un inhibidor de la transcripción dependiente de la RNA polimerasa II. Cuando las BMMCs fueron pre-incubadas con Act D (5 $\mu$ M) 15 minutos antes de la estimulación con LPS, observamos que la secreción de TNF fue bloqueada a partir de las 2 horas (figura 10A). Este resultado indica que el TNF que se secreta después de las 2 horas se está produciendo *de novo*, mientras que el TNF que se secreta durante la primera hora es el preformado. Dado que la inhibición de la secreción de TNF producida por el GTS-21 fue evaluada 4 horas después del estímulo con LPS era necesario discriminar cuál de las 2 fuentes de TNF estaba siendo afectada por este agonista de la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR. Así, realizamos el mismo curso temporal que en la figura 10A pero pre-incubando con GTS-21. En este experimento se encontró que el GTS-21 inhibió la secreción de TNF a partir de la primera hora de estimulación con LPS lo que indica que la activación de los nAChR $\alpha 7$  inhibe tanto la secreción de TNF preformado como la secreción del TNF sintetizado *de novo* (figura 10B).

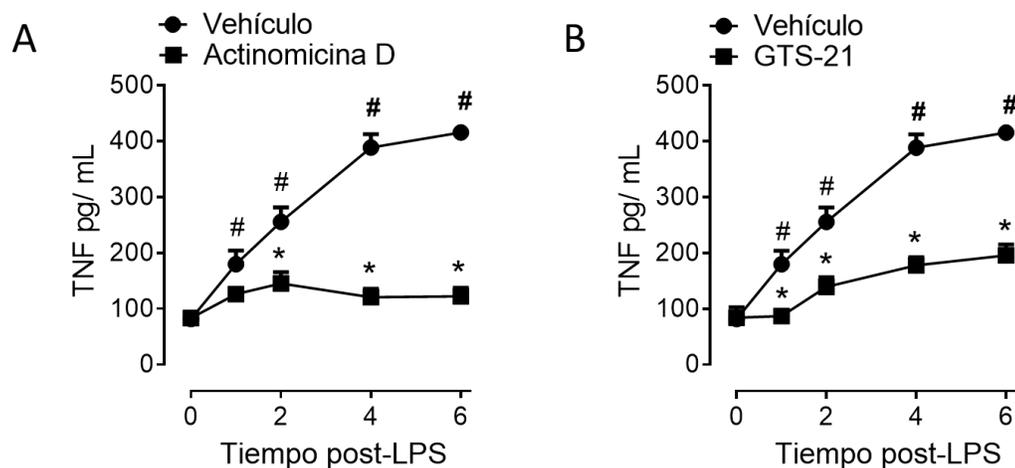


Figura 10. El GTS-21 previene la secreción del TNF preformado y del sintetizado *de novo*. Curso temporal de BMMCs pre-incubadas con Actinomicina D (Panel A) o con GTS-21 (Panel B) y estimuladas con LPS, n=6. Prueba de Dunnett #P<0.05 vs el vehículo al tiempo 0, \*P<0.05 vs el vehículo en el mismo tiempo.

### 5.- La estimulación del TLR-4 induce la secreción de CCL-2 y el pre-tratamiento con GTS-21 la inhibe.

Con el objetivo de averiguar los mecanismos mediante los que la activación del nAChR $\alpha$ 7 evita la secreción de TNF inducida por LPS, decidimos evaluar los efectos del GTS-21 sobre la secreción de CCL-2, quimiocina que no se encuentra preformada ni almacenada en los gránulos citoplasmáticos de las células cebadas. La figura 11A muestra que el LPS induce la secreción de CCL-2, aproximadamente 1500 pg/mL, y el pre-tratamiento con GTS-21 previene hasta en un 50% la secreción de esta quimiocina 4 horas después de la estimulación con LPS, de manera similar a la inhibición provocada con el TNF (Figura 11B) Este resultado confirmó el hecho de que la activación de los nAChR $\alpha$ 7 afecta vías de señalización que conducen a la síntesis *de novo* en las células cebadas.

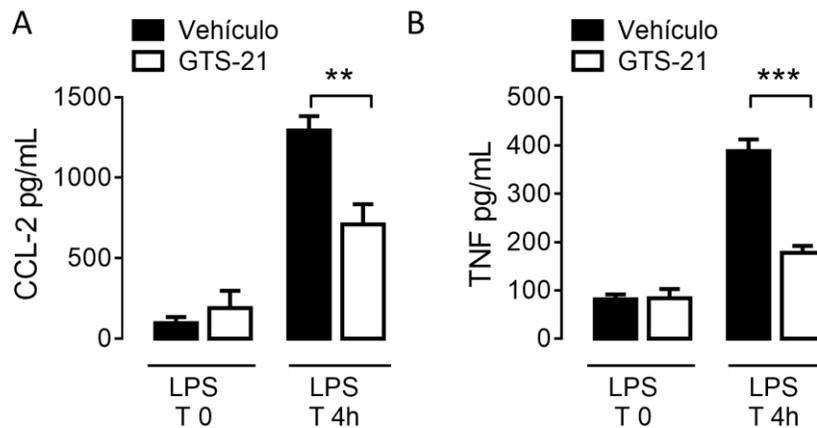


Figura 11. El GTS-21 afecta la secreción de CCL-2 en BMMCs estimuladas con LPS. Panel A concentración de CCL-2 en los sobrenadantes de BMMCs pre-incubadas con GTS-21 y estimuladas con LPS, n=4. Prueba de t \*\*P=0.0097. Panel B concentración de TNF en los sobrenadantes de BMMCs pre-incubadas con GTS-21 y estimuladas con LPS, n=6 B \*\*\*P<0.001.

## 6.- La activación de los nAChR $\alpha$ 7 evita la activación de la vía IKK que induce la síntesis de *novo* y la secreción del TNF preformado en BMMCs.

En la figura 12A se utilizó un inhibidor de IKK (BAY117055) y se realizó un curso temporal de estimulación con LPS. En las células tratadas con BAY117055, la inhibición de TNF inició a partir de la primera hora de estimulación con LPS, comparada con las células tratadas sólo con vehículo. Sin embargo, esta inhibición no fue total, ya que a las 4 y 6 horas post estimulación con LPS la secreción de TNF fue significativamente más alta con respecto al tiempo cero (ANOVA de una vía  $F_{(41,50)} = 46.43$ ,  $*P < 0.001$ ). Estos resultados sugerían una importante participación de IKK en los fenómenos de secreción temprana de TNF, probablemente dependiente de la activación de SNAP-23. Sin embargo, el papel de IKK sobre la síntesis de *novo* de TNF es parcial dado que, aún con el inhibidor, las células continuaron produciendo y secretando esta citocina. Por otra parte, en las células pre-tratadas con BAY117055 la secreción de CCL-2 no se afecta, esto indica que la secreción de CCL-2 no depende de la activación de IKK (figura 12B).

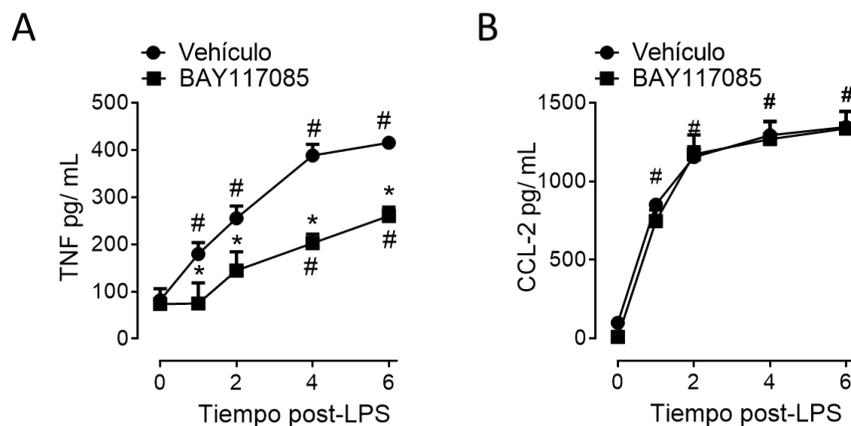


Figura 12. La cinasa IKK participa en la secreción de TNF pero no en la de CCL-2. El panel A muestra las concentraciones peritoneales de TNF en BMMCs pre-incubadas con BAY117085,  $n=7$ . Prueba de Dunnett  $\#P < 0.05$  vs el tiempo 0 en el mismo tratamiento,  $*P < 0.05$  vs el mismo tiempo entre los diferentes tratamientos. Los sobrenadantes de las células utilizadas en el panel A se usaron para evaluar la secreción de CCL-2 (panel B). Prueba de Dunnett  $\#P < 0.05$  vs el tiempo 0 del vehículo.

Una vez caracterizado el papel de IKK en la secreción de TNF inducida por LPS, se evaluó el efecto del GTS-21 sobre la vía IKK-NFκB. Los resultados muestran que el pre-tratamiento con GTS-21 evitó la fosforilación de IKK y de la subunidad p65 del factor de transcripción NFκB (\*P<0.05 vs LPS, n=4, figura 13), así como la disminución de la acumulación de RNAm de TNF (figura 14).

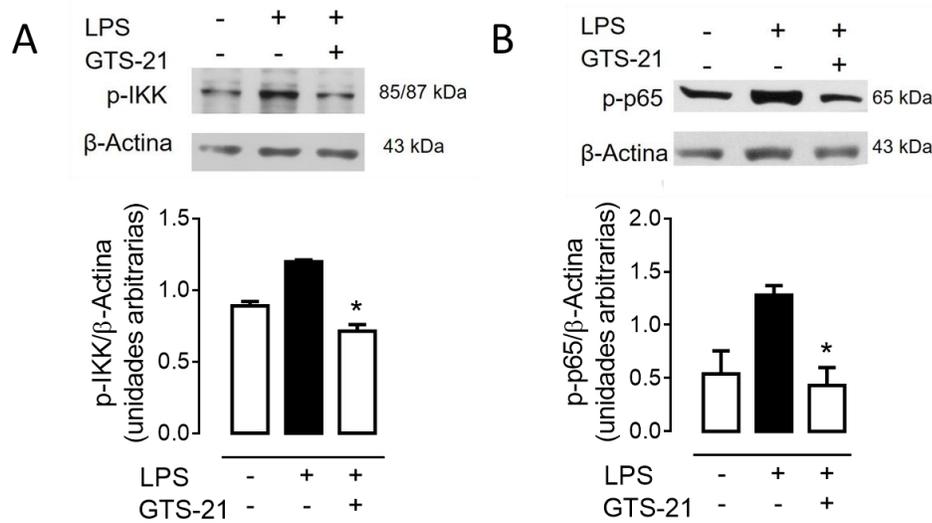


Figura 13. El GTS-21 evita la fosforilación de IKK y p65 involucradas en la síntesis y secreción de TNF inducida por LPS. Los paneles muestran la imagen representativa de tres experimentos independientes (paneles superiores) y la densitometría (paneles inferiores) del western blot para la fosforilación de IKK y de p65 (panel A y B, n=3. Prueba de Dunnett \*P<0.05).

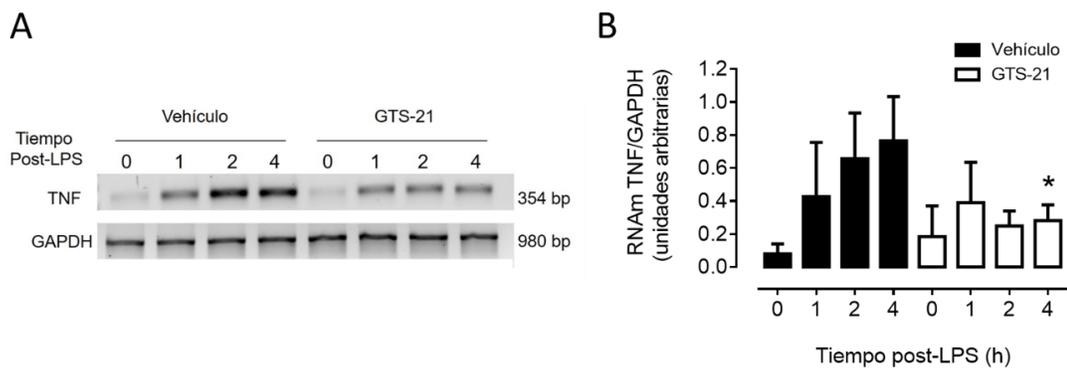


Figura 14. El GTS-21 evita la acumulación del RNAm del TNF inducida por LPS en BMMCs. El panel A muestra una imagen representativa de 4 experimentos independientes y el panel B la densitometría del gel de agarosa resultado de la PCR para el RNAm de TNF, prueba de Dunnett \*P<0.05 vs LPS, n=4.

### 7.- ERK 1/2 participa en la secreción del TNF preformado en BMMCs estimuladas con LPS y su fosforilación se previene por el GTS-21.

En un estudio previo del laboratorio se encontró que ERK participa en el fenómeno de secreción temprana de TNF. En ese estudio se evaluó el efecto del PD98059, un inhibidor de MEK2 (cinasa que controla la fosforilación de ERK), y se encontró que la secreción de TNF se prevenía en presencia del inhibidor. Con el objetivo de profundizar en el papel de ERK sobre este fenómeno de secreción, se realizó un curso temporal de 6 horas de estimulación con LPS. Como se observa en la figura 15A, el PD98059 previene completamente la secreción de TNF desde la primera hora de estimulación con LPS y persiste hasta las 6 horas (ANOVA de dos vías  $F_{(36,45)} = 114.92$ ,  $P < 0.001$ ). Sin embargo, la secreción de CCL-2 no se vio afectada con el pre-tratamiento de PD98059 (figura 15B).

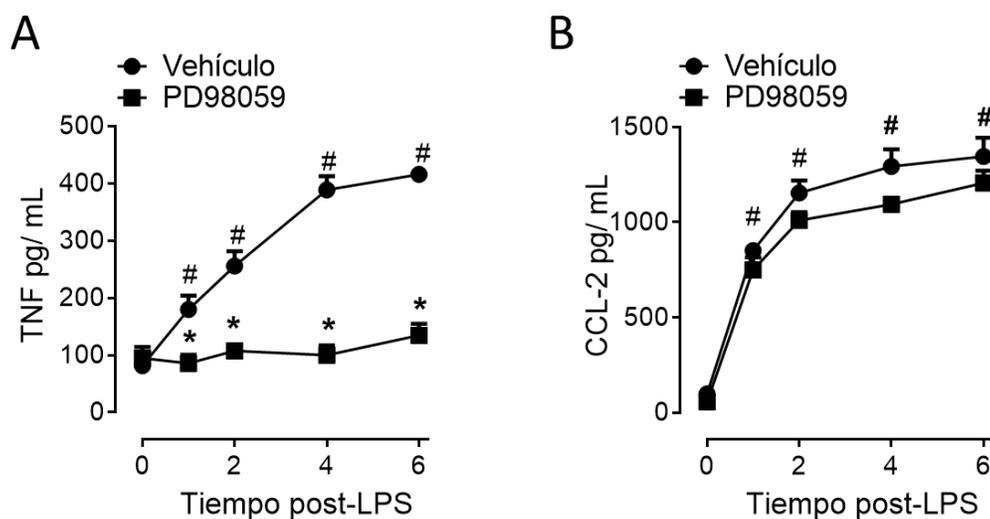


Figura 15. La proteína ERK participa en la secreción y síntesis de *novo* de TNF. Panel A, concentración de TNF en los sobrenadantes. Prueba de Dunnett # $P < 0.05$  vs el tiempo 0 en el mismo tratamiento, \* $P < 0.05$  vs el mismo tiempo entre los diferentes tratamientos. Panel B, los sobrenadantes de las células utilizadas en el panel A se usaron para evaluar la secreción de CCL-2. Prueba de Dunnett # $P < 0.05$  vs el tiempo 0 del vehículo.

El efecto inhibitor del PD98059 también se observó mediante microscopía confocal (figura 16). Las células pre-tratadas con el inhibidor de MEK2 presentan un incremento en los niveles citoplasmáticos de TNF (marca de color verde) comparadas con aquellas que sólo fueron estimuladas con LPS (ANOVA de una vía  $F_{(2,44)}=33.62$ ,  $P<0.001$ ). Este resultado confirma la importancia de ERK en la secreción de TNF preformado y en el sintetizado de *novo*.

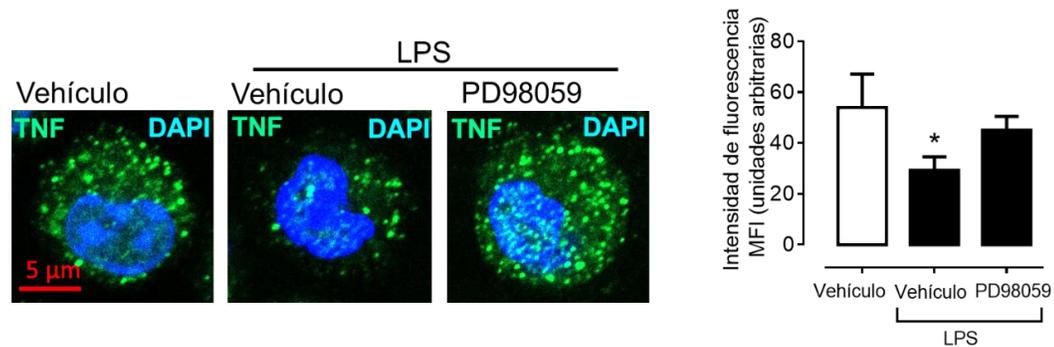


Figura 16. La proteína ERK participa en la secreción de TNF inducida por LPS. Panel A, imagen representativa de la inmunofluorescencia observada por microscopía confocal que muestra la localización intracelular del TNF (marca de color verde). Panel B, densitometría de la intensidad de fluorescencia de las imágenes obtenidas por microscopía confocal. Prueba de Dunnett \* $P<0.05$ ,  $n=3$ .

Posteriormente evaluamos si la activación de los receptores nAChR $\alpha 7$  afectaba la actividad de ERK y encontramos que el GTS-21 previno la fosforilación de ERK estimulada por LPS (figura 17A).

Por otra parte, evaluamos si la participación de ERK en la síntesis de *novo* del TNF era dependiente de la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B, pero este efecto resultó ser independiente de esa vía transcripcional dado que el PD98059 no previno la fosforilación de p65 inducida por el LPS (figura 17B).

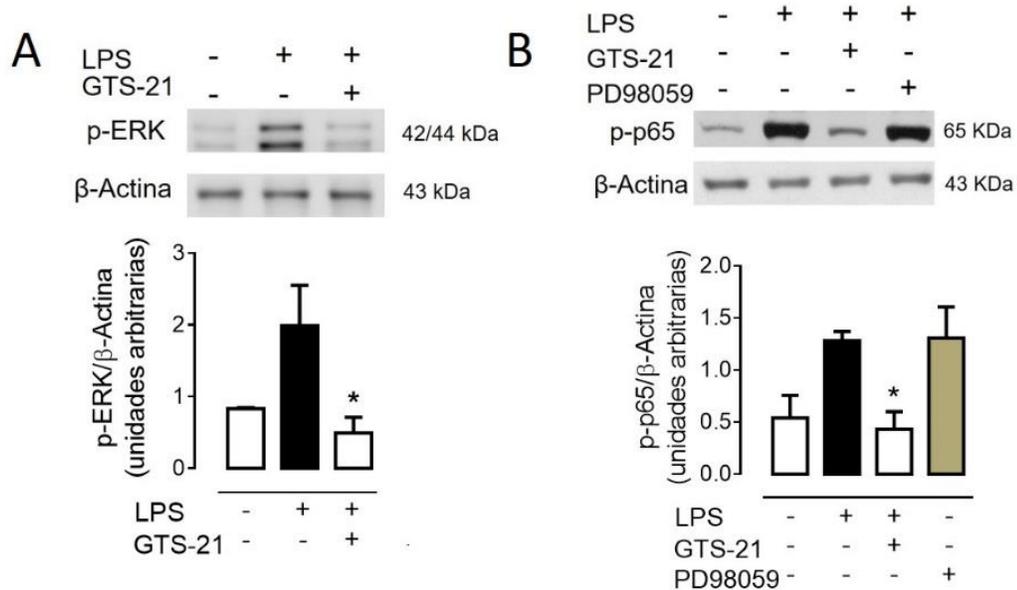


Figura 17. La fosforilación de ERK inducida por LPS es prevenida por activación del nAChR $\alpha$ 7. Panel A, inhibición de la fosforilación de ERK mediada por el GTS-21. Panel B, efectos del PD98059 sobre la fosforilación de P65 inducida por LPS en BMMCs. Prueba de Dunnett \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ .

Con el objetivo de profundizar en el papel de ERK sobre la secreción de TNF realizamos una búsqueda bibliográfica en la cual encontramos que, en los macrófagos, ERK activa a una metaloproteinasas llamada TACE, en la treonina 754, la cual se encarga de procesar al TNF en la membrana plasmática y liberarlo en su forma soluble. Por esta razón decidimos evaluar si en las células cebadas la TACE afecta la secreción de TNF tras la activación del receptor TLR-4. Para ello, usamos un inhibidor de la TACE, TAPI-1, y evaluamos la secreción de TNF en los sobrenadantes de células estimuladas con LPS. Como se observa en el panel A de la figura 18, el TAPI-1 inhibió completamente la secreción de TNF inducida por LPS (ANOVA de dos vías  $F_{(41,50)} = 77.43$ ,  $P < 0.001$ ), de una manera muy similar a la inhibición evocada por el PD98059 (figura 15, panel A). Dada la interacción entre ERK y la TACE previamente reportada por otros grupos de investigación, decidimos evaluar la fosforilación de la TACE en respuesta al LPS. La figura 18B muestra que el estímulo con LPS induce la fosforilación de la TACE, efecto que se previene con la pre-incubación con PD98059.

Este resultado coloca a la TACE río arriba de MEK2 en la vía de secreción de TNF inducida por la activación del receptor TLR-4.

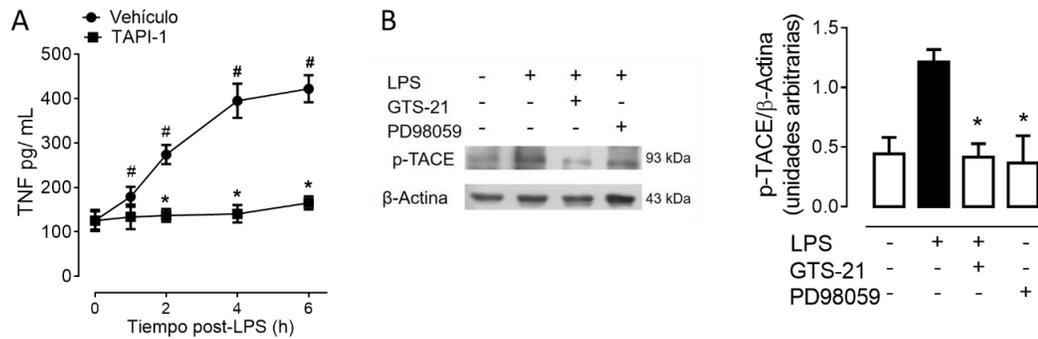


Figura 18. La activación de la TACE favorece el fenómeno de secreción de TNF estimulado por LPS en las BMMCs. Panel A, curso temporal de secreción de TNF en BMMCs pre-incubadas con TAPI y estimuladas con LPS, prueba de Dunnett \* $P < 0.05$  vs el mismo tiempo en los diferentes tratamientos, <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs el tiempo 0 en las células tratadas con vehículo. Panel B, imagen representativa y densitometría del efecto del PD98059 sobre la fosforilación de la TACE inducida por LPS. Prueba de Dunnett \* $P < 0.05$  vs LPS.

En las células pre-incubadas con GTS-21 se inhibió la fosforilación de la TACE inducida por LPS (figura 18B). Este resultado sugiere que la activación del receptor TLR-4 requería la actividad enzimática de la TACE para la secreción de TNF. Corroboramos este hallazgo mediante inmunofluorescencia, como se aprecia en la imagen 19, el estímulo sólo con LPS induce el vaciamiento de los gránulos contenedores de TNF (la marca de color verde está casi ausente en el citoplasma de la célula) mientras que el pre-tratamiento con TAPI-1 mantiene el TNF en el citoplasma de la célula casi con la misma intensidad que en las células que no fueron estimuladas (figura 19).

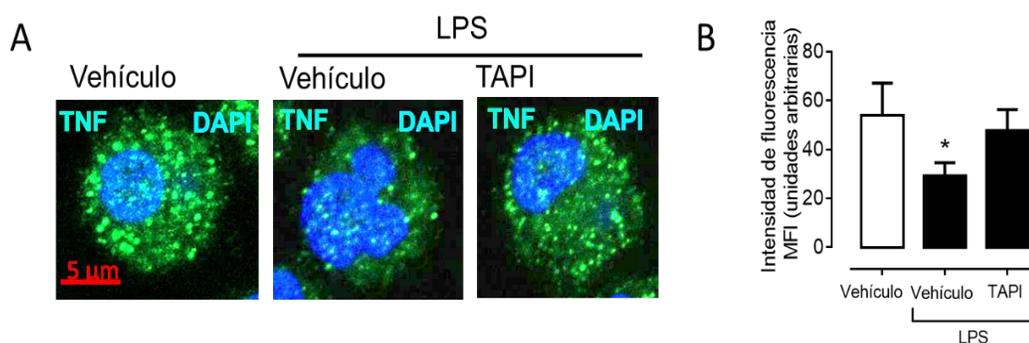


Figura 19. Participación del a TACE en la secreción de TNF inducida por LPS en BMMCs. Panel A, imagen representativa obtenida mediante microscopía confocal en las que se observa el TNF (marca color verde) citoplasmático. Panel B, densitometría de las imágenes obtenidas. Prueba de Dunnett \* $P < 0.05$  vs vehículo.

### **8.-Los mecanismos moleculares que inducen la inhibición en la secreción de TNF tras la estimulación del nAchR $\alpha$ 7 no son dependientes del calcio ni de la cinasa Fyn, pero sí de JAK.**

Para evaluar los mecanismos moleculares mediante los que la activación de los receptores nAchR $\alpha$ 7 inhibe la vía del receptor TLR-4, decidimos evaluar los efectos que tienen algunas de las proteínas o eventos que suceden río abajo del receptor nAchR $\alpha$ 7 sobre la secreción de TNF o sobre las moléculas involucradas en el proceso de secreción de esta citocina.

El nAchR $\alpha$ 7 es un canal iónico que permite la entrada de calcio a la célula, por este motivo utilizamos BAPTA, un agente quelante de calcio, y evaluamos la secreción de TNF en los sobrenadantes celulares después del estímulo con LPS. La figura 20A muestra que en las células pre-tratadas con BAPTA, la secreción de TNF estimulada por el LPS (barras negras) es menor que aquella inducida en las células pre-tratadas sólo con vehículo (ANOVA de una vía  $F_{(3,10)} = 8.61$ ,  $P = 0.004$ , comparaciones múltiples de Dunnett  $p < 0.05^*$  vs LPS en cada tratamiento,  $p < 0.05^\#$  vs LPS con vehículo). Este resultado indica que el calcio es requerido para la secreción de TNF tras la activación del receptor TLR-4. De esta manera el pre-tratamiento con BAPTA

no afectó el efecto inhibitorio que el GTS-21 ejerce sobre el fenómeno de secreción de TNF (figura 20A).

Se ha reportado la unión de algunas proteínas de la familia de Src, como Fyn y Lyn, a algunas subunidades de los receptores nicotínicos<sup>56,43</sup>. Utilizando BMMCs provenientes de ratones Fyn<sup>-/-</sup> y Lyn<sup>-/-</sup> y evaluamos la secreción de TNF dada por la estimulación del receptor TLR-4. La figura 20B muestra que, como se esperaba, la secreción de TNF inducida por LPS en las células Fyn<sup>-/-</sup> es mayor que en las células WT (ANOVA de una vía  $F_{(3,10)} = 8.61$ ,  $P=0.004$ ). A pesar de saber que Fyn participa de manera negativa en la vía del receptor TLR-4<sup>57</sup> decidimos evaluar si su participación en la vía del receptor nicotínico tenía un peso mayor y favorecía la inhibición en la secreción de TNF dada por el estímulo con LPS. Sin embargo, el pre-tratamiento con GTS-21 en las células Fyn<sup>-/-</sup> no revirtió su efecto inhibitorio sobre la secreción de TNF (panel B de la figura 20). Por otra parte, los experimentos realizados en las células Lyn<sup>-/-</sup> muestran que en estas células la secreción de TNF estimulada por LPS es menor que en las células WT (ANOVA de una vía  $F_{(3,8)} = 10.61$ ,  $P=0.0037$ ). No obstante, el pre-tratamiento con GTS-21 no revirtió el efecto inhibitorio sobre la secreción de TNF (figura 20C).

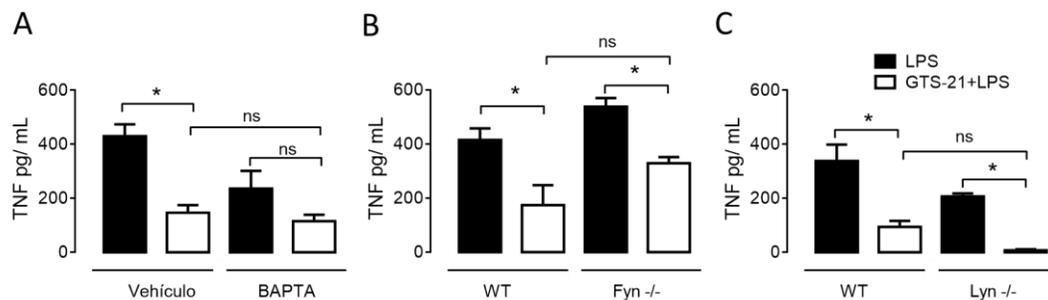


Figura 20. El calcio, la cinasa Fyn y la cinasa Lyn no intervienen en las vías antiinflamatorias del nAChR $\alpha$ 7. Panel A, efecto de pre-incubación con BAPTA sobre la secreción de TNF inducida por LPS en BMMCs. Panel B y C, concentraciones de TNF en los sobrenadantes de BMMCs provenientes de ratones carentes de la cinasa Fyn y Lyn estimuladas con LPS. Prueba de Dunnett \* $P<0.05$ ,  $n=3$  en todos los paneles.

La cinasa Jak-2 es una de las proteínas que ha sido estudiada como posible responsable de los efectos anti-inflamatorios que el receptor nAChR $\alpha$ 7 ejerce sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a la estimulación del TLR-4.

Dado que el GTS-21 inhibió la fosforilación de p65 y de ERK inducidas por LPS se decidió evaluar el efecto que el AG490, inhibidor de Jak-2, tenía sobre ese efecto. Como se observa en la figura 21A el AG490 no revierte la inhibición provocada por el GTS-21 sobre la fosforilación de p65 inducida por LPS, pero sí la de ERK (figura 21B) (ANOVA de una vía  $F_{(3,27)} = 4.16$ ,  $P = 0.015$ . Además, mediante microscopía confocal se observó que el AG490 previno la acumulación de TNF citoplasmática que el GTS-21 ocasiona en células tratadas con LPS (ANOVA de una vía  $F_{(3,71)} = 30.92$ ,  $P < 0.001$ ), figura 22.

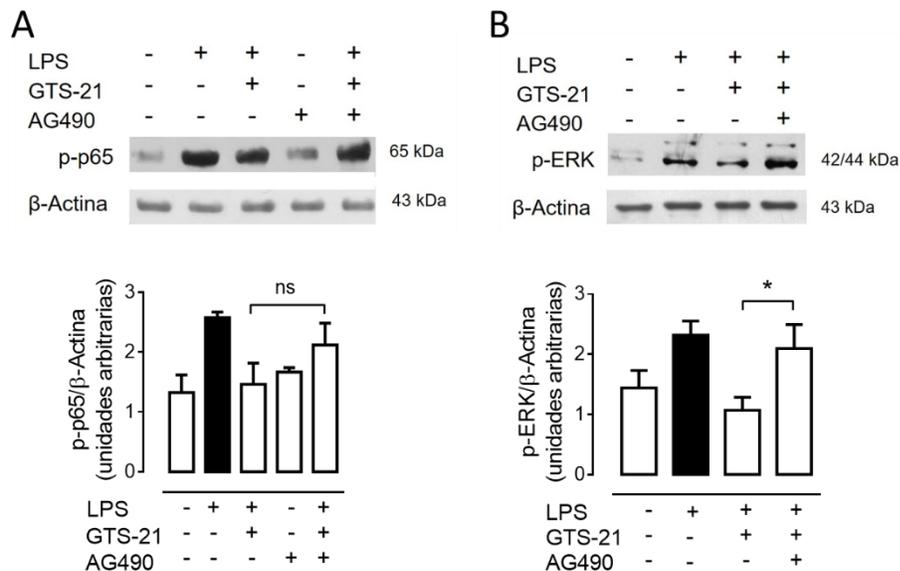


Figura 21. Mecanismos moleculares mediante los cuales el nAChR $\alpha$ 7 previene la secreción de TNF en células cebadas estimuladas con LPS. Efecto del AG490 sobre la fosforilación de p65 (panel A) y ERK (panel B) en BMMCs estimuladas con LPS. Comparaciones múltiples de Dunnett \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ .

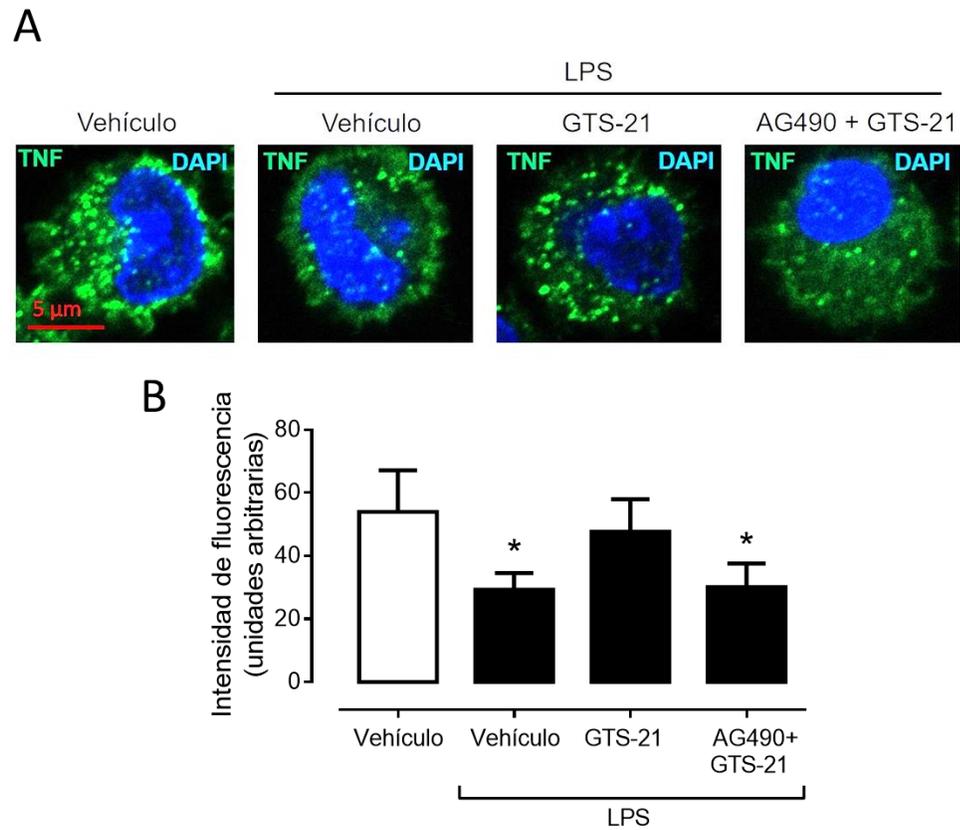


Figura 22. Participación de Jak-2 sobre la secreción de TNF inducida por LPS en células cebadas. Panel A, imagen representativa obtenidas mediante microscopía confocal en las que se observa el TNF (marca color verde) citoplasmático. Panel B, densitometría de las imágenes obtenidas. Prueba de Dunnett \* $P < 0.05$  vs vehículo.

## Discusión

En esta primera parte de la tesis, mostramos que la activación del receptor nAChR $\alpha$ 7 con el agonista específico GTS-21 disminuye la liberación de TNF en las células cebadas después de un reto con LPS *in vivo* y el mecanismo molecular de dicha inhibición fue descrito utilizando células cebadas derivadas de médula ósea. Así, se describió que la activación del receptor nAChR $\alpha$ 7 con el agonista específico GTS-21 disminuye la liberación del TNF pre-formado y sintetizado de novo tras la estimulación con LPS. El efecto inhibitorio de GTS-21 implica el bloqueo de la activación de la cinasa ERK1/2 inducida por TLR4, junto con la inhibición de la actividad de TACE, de una manera dependiente de JAK-2.

Las células cebadas son importantes reguladores de las respuestas inmunes innatas y adaptativas y son actores esenciales en las reacciones alérgicas<sup>23,58,59</sup>. En los ratones, ejercen un papel protector en una serie de infecciones bacterianas que ocurren en la cavidad peritoneal y otras localizaciones anatómicas por su capacidad de reconocer patrones moleculares asociados a microorganismos microbianos (PAMPs) y la secreción robusta de mediadores pro-inflamatorios capaces de orquestrar la respuesta inflamatoria después del daño al tejido<sup>60</sup>. Sin embargo, la activación excesiva de las células cebadas se ha asociado a reacciones inflamatorias deletéreas<sup>61</sup>. A pesar de la importancia de su papel en las respuestas inflamatorias locales y sistémicas, no se ha caracterizado completamente la regulación de las células cebadas por la activación del sistema nervioso. Nuestros resultados muestran que después de la administración ip de LPS el GTS-21 bloqueó la producción temprana de TNF, un efecto que depende de la activación de las células cebadas y está controlada por el reflejo antiinflamatorio colinérgico<sup>8</sup>. Los datos indican fuertemente que la secreción de citocinas en las células cebadas está bajo el control del reflejo antiinflamatorio colinérgico vagal y que los nAChR $\alpha$ 7 ejercen un control negativo sobre la secreción de citocinas en este importante tipo celular.

Debido a la importancia de las células cebadas en las reacciones alérgicas, se ha estudiado el efecto de la nicotina y los agonistas de los receptores nicotínicos sobre el

estímulo de alta intensidad dado por la activación del receptor FcεRI en la superficie de las células cebadas<sup>35,62</sup>. En este trabajo se decidió analizar el efecto de la activación de los receptores nicotínicos tras la estimulación del receptor de TLR4, ya que se considera un estímulo de baja intensidad que no conduce a la desgranulación anafiláctica, sino que induce la síntesis y secreción de citocinas que contribuyen de manera importante a la defensa contra bacterias y también a la inflamación crónica asociada con enfermedades degenerativas<sup>63</sup>. Nuestros resultados *in vitro* indican que se requieren concentraciones relativamente altas de nicotina o GTS-21 para la inhibición aguda de la producción de citocinas en las BMMCs, las concentraciones de GTS-21 utilizadas en esta investigación coinciden a las utilizadas en otros estudios. Kageyama (2012) reportó que las concentraciones milimolares de nicotina y acetilcolina inhibieron la desgranulación inducida por la activación del receptor FcεRI<sup>35</sup>. En BMMCs, encontramos que la expresión del RNAm para la subunidad α7 por RT-PCR, pero también el RNAm para las subunidades α3, β4, α4 y β2. Nuestros resultados están en línea con los obtenidos en BMMCs diferenciadas de ratones Balb/c, donde se reportó la expresión de las subunidades α4, α7, α2 y β4 de nAChR<sup>35</sup>. Por otro lado, en la línea celular basófila RBL-2H3 se detectaron las subunidades α7, α9 y α10 nAChR<sup>62</sup>. La presencia de distintas subunidades de la nAChR en las CC sugiere la existencia de heterómeros funcionales de este receptor, como se ha descrito en las neuronas<sup>64</sup>. Curiosamente, en las células RBL, las acciones inhibitoras de la nicotina fueron bloqueadas utilizando siRNA para las subunidades α7 y α9 nAChR<sup>62</sup>, lo que sugiere la participación de un receptor heteromérico en las acciones inhibitoras de la acetilcolina en este tipo de células.

En otros estudios se ha analizado la inhibición de la producción de citocinas por agonistas nicotínicos en macrófagos y microglía<sup>49,65,66</sup>. En esas células, el TNF se produce después de la transcripción dependiente de NFκB y de la estabilización del RNAm. Las CC son el único tipo de células inmunitarias que mantienen el TNF como una citocina preformada en gránulos secretores especializados en su citoplasma<sup>67</sup> y este TNF incrementa después de la sensibilización con IgE<sup>55</sup>. Después de la activación del receptor TLR4, el TNF preformado es rápidamente secretado y alcanza los niveles

máximos 1 ó 2 horas después de la estimulación. La secreción del TNF preformado requiere la movilización del calcio y la activación de IKK, que fosforila la proteína SNARE SNAP-23 facilitando la fusión de la membrana vesicular-plasma<sup>18</sup>. IKK también conduce a la fosforilación de NFκB y a la translocación nuclear necesaria para la síntesis del RNAm del TNF. Los datos de esta tesis que muestran que la estimulación de nAChRα7 impide la fosforilación de IKK y de NFκB inducida por el TLR4, así como con la acumulación máxima de RNAm de TNF, concuerdan con los obtenidos en estudios que utilizan macrófagos, donde la incubación con concentraciones micromolares de agonistas nicotínicos impide la producción de TNF, IL-1, e IL-6, pero no la de IL-10<sup>65</sup>. En esas células, la inhibición de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias se relacionó con la disminución de la actividad de la vía IKK-NFκB<sup>49,50,68</sup>. Se ha descrito que después de la activación de nAChR también se producen modificaciones post-transcripcionales en las moléculas de la vía del TLR4 que contribuyen a los efectos inhibidores de la activación del receptor nicotínico. Se ha demostrado que el microRNA-124 es un mediador crítico del reflejo antiinflamatorio colinérgico, mediando la degradación del RNAm de IL-6<sup>69</sup>.

Además de la importancia de la fosforilación de IKK y NFκB, resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado que la activación de MAPK ERK1/2 es necesaria para la síntesis *de novo* de TNF inducida por LPS en BMMCs<sup>17</sup>. El papel central de la vía ERK1/2 se demostró en el presente trabajo por el efecto del inhibidor de MEK, el PD98059, que abolió completamente la secreción de TNF sin afectar a la fosforilación de p65 inducida por LPS. El pre-tratamiento con GTS-21 inhibió la fosforilación de ERK 1/2 y previno la pérdida de la señal intracelular de TNF inducida por el LPS, añadiendo el nodo MEK-ERK1/2 a las moléculas del sistema de señalización del receptor TLR4 afectadas por la activación nAChRα7.

Algunos estudios indican que la fosforilación de ERK1/2 es necesaria para la activación de la metalopeptidasa ADAM-17 (TACE), una enzima responsable de la escisión de pro-TNF y de la liberación del TNF maduro<sup>70</sup>. La TACE es fosforilada por ERK 1/2 en el residuo Treonina (735) en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo el LPS. La fosforilación dependiente de ERK aumenta la actividad de TACE y provoca un

aumento en la secreción de TNF (28). En las células utilizadas en el presente estudio, el papel de TACE se confirmó ya que su inhibidor específico, TAPI, fue capaz de inhibir totalmente la secreción de TNF inducida por el LPS. Hasta donde tenemos conocimiento, el presente trabajo muestra por primera vez que la fosforilación de la TACE dependiente de ERK es necesaria para la secreción de TNF después de la activación del TLR4 en CC y que esta fosforilación se evita por la activación de nAchR $\alpha$ 7. Las proteínas río arriba que modulan la actividad de ERK1/2 después de la activación de TLR4 incluyen a TPL-2<sup>72</sup>. Averiguar si la estimulación del nAchR $\alpha$ 7 afecta la actividad de TPL2 en células cebadas es materia de futuros experimentos.

Nuestros resultados muestran que la activación de JAK-2 está implicada en los efectos inhibitorios de nAchR $\alpha$ 7 en la vía de señalización TLR4 y están en línea con los obtenidos en macrófagos, donde JAK-2 se recluta a la subunidad  $\alpha$ 7 de los receptores nicotínicos para promover la fosforilación del factor de transcripción STAT3 para prevenir la síntesis de citocinas<sup>73</sup>. Nuestros resultados también son similares a los obtenidos en macrófagos en los que el inhibidor de JAK-2 (AG490) previno los efectos inhibitorios de la activación del nAchR $\alpha$ 7 sobre la liberación de TNF<sup>74</sup>. Sin embargo, en las CC los efectos preventivos de AG490 no fueron completos para la fosforilación de p65 (Figura 21), lo que sugiere que en las CC, otras proteínas, además de JAK-2 pueden participar en las acciones inhibitorias de los agonistas nicotínicos.

Aunque las acciones inhibitorias de GTS-21 se observaron en la producción de CCL2, los eventos que llevaron a su secreción después de la activación del receptor TLR4 en las CC no están relacionados con la activación de IKK o ERK1/2, ya que ni el BAY117055 ni el PD98059 fueron capaces de prevenir su secreción en respuesta al LPS. En las BMMCs, se ha demostrado que CCL2 no se mantiene en los gránulos secretores<sup>75</sup>, sino que se sintetiza *de novo* tras la estimulación del receptor Fc $\epsilon$ RI<sup>76</sup> y se secreta por un mecanismo que requiere entrada de calcio extracelular<sup>77</sup>. Nuestros resultados indican que las acciones negativas de la activación de los receptores nicotínicos sobre la producción de citocinas en las CC incluyen el bloqueo de la secreción de agentes quimiotácticos (tales como CCL2) por un mecanismo que no está relacionado con la inhibición de IKK o ERK 1/2 y todavía tiene que ser descrito.

## Conclusiones

La activación de los nAChR $\alpha$ 7, con GTS-21, inhibe la secreción de TNF inducida por LPS al evitar la activación de moléculas importantes para la síntesis *de novo* y la secreción de los gránulos preformados.

Estudios previos en el laboratorio colocaban a la cinasa ERK 1/2 en la vía de señalización del receptor TLR-4 que induce la secreción de TNF, esta tesis añade la participación de la metaloproteinasas TACE como sustrato de ERK 1/2 en este sistema de transducción de señales. Además, logramos caracterizar los puntos de inhibición que la activación del receptor nAChR $\alpha$ 7 ejerce sobre la vía de señalización del receptor TLR-4, estos hallazgos se resumen en la figura 23.

Finalmente encontramos que los efectos inhibidores que los receptores nAChR $\alpha$ 7 ejercen sobre el nodo ERK1/2-TACE están mediados de manera parcial por la cinasa JAK-2.

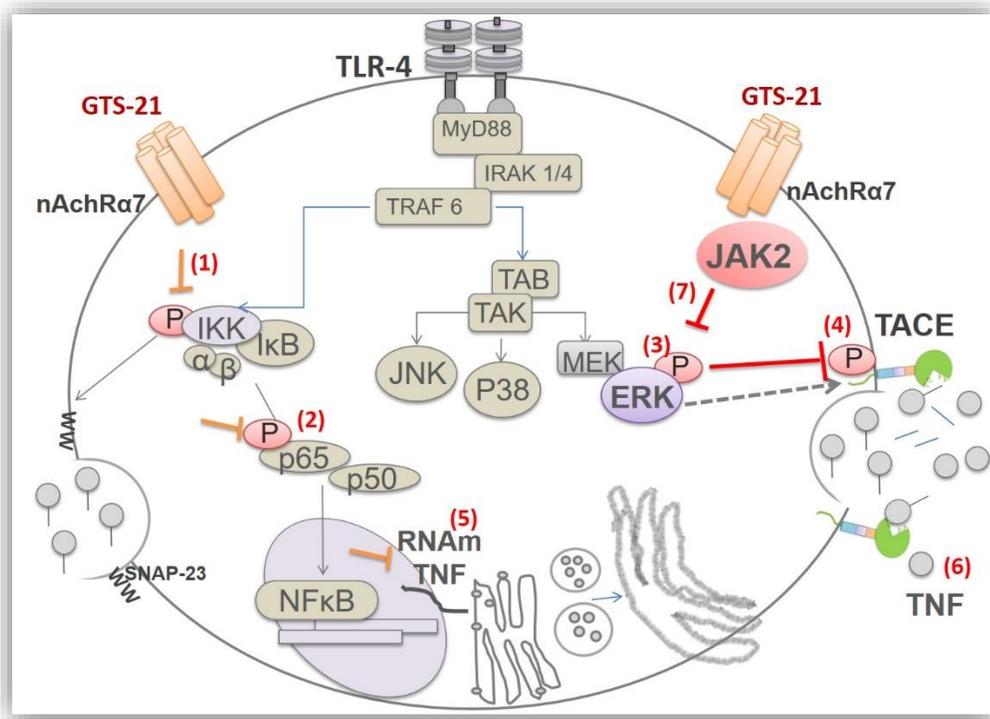


Figura 23. Elementos implicados en las acciones inhibitorias de la activación de nAchR $\alpha$ 7 ejercen en la vía de señalización del receptor TLR-4 que conducen a la secreción de TNF. Los puntos de inhibición que la activación del receptor nAchR $\alpha$ 7 ejerce sobre la vía de señalización del receptor TLR-4 comprenden el bloqueo de la fosforilación de IKK (1), de p65 (2), de ERK (3) y de la TACE (4), así como la inhibición en la acumulación del RNAm de TNF (5) evitando el proceso de secreción de esta citocina (6). Los efectos inhibitorios que los receptores nAchR $\alpha$ 7 ejercen sobre el nodo ERK1/2-TACE están mediados de manera parcial por la cinasa JAK-2 (7).

## **SEGUNDA SECCIÓN**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del estrés crónico sobre la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS en ratones SW.

### **Objetivos particulares**

- 1.- Evaluar la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS en ratones sometidos a dos diferentes modelos de estrés crónico (estrés crónico ligero y estrés por aislamiento social).
- 2.- Evaluar la secreción de corticosterona y de vasopresina en respuesta al LPS en ratones sometidos a estrés crónico ligero y a estrés por aislamiento social.
- 3.- Caracterizar si se desarrollan conductas tipo ansiedad y tipo depresión en ratones SW después de ser sometidos a los modelos de estrés crónico.

## Material y métodos

Animales.-Para todos los protocolos se utilizaron ratones Swiss-Webster machos (SW, código de cepa 024, Charles River, MD) que se mantuvieron en condiciones de agua y alimento *ad libitum* y con el ciclo luz oscuridad invertido (de 9:00 – 21:00 oscuridad y de 21:00 – 9:00 luz). Los grupos de ratones estresados y los grupos control estuvieron alojados en habitaciones separadas.

Protocolos de estrés crónico.- Para evaluar los efectos del estrés sobre la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS se probaron dos diferentes protocolos de estrés crónico.

*1.- Estrés crónico impredecible:* El modelo de estrés crónico impredecible (ECI) es típicamente utilizado para evaluar el efecto de fármacos con actividad antidepresiva, dado que, durante la exposición a los estresores, los roedores desarrollan conductas tipo depresivas evaluadas como la disminución en el consumo de agua azucarada<sup>78</sup>.

Para este protocolo, ratones de 8 semanas de edad fueron expuestos a un estresor diferente (ver tabla 3), diariamente de manera aleatoria, durante un periodo de 4 semanas. Es importante mencionar que este protocolo de estrés crónico ha sido utilizado por otros grupos de investigación, y cada grupo utiliza una diferente combinación de estresores, diferentes tiempos de exposición a los estresores y la duración del protocolo va desde las 4 a 12 semanas<sup>79, 78</sup>. En la siguiente tabla se muestra el tipo y duración de los estresores utilizados en este proyecto.

<b>Estresor</b>	<b>Descripción</b>	<b>Duración</b>
Ciclo invertido	Inversión del ciclo luz oscuridad.	24 h
Frío	El ratón es sumergido en agua a 4°C e inmediatamente se regresa a su caja.	~ 1 min
Cama húmeda	Agregar 200 ml de agua para mojar el aserrín de la cama.	4 h
Aserrín de rata	Cambiar el aserrín de la cama por aserrín que haya sido utilizado como cama de ratas.	4 h
Caja sin aserrín	Quitar el aserrín de la cama.	4 h
Caja inclinada	Inclinar 45° la caja con ratones.	4 h
Restricción de movimiento	Introducir al ratón en un tubo eppendorf de 50 mL, con ventilación adecuada.	30 min
Cama con mal olor	Agregar 20 mL de agua con aromatizante a la cama de aserrín.	4 h

Tabla 3. Descripción de los estresores utilizados para el protocolo de ECI

2.- *Estrés por aislamiento social*: Este modelo ha sido usado para evaluar el desarrollo de conductas tipo ansiedad y tipo depresivas <sup>80, 81</sup>. En este protocolo de estrés los ratones de 21 días de edad (recién destetados) fueron alojados individualmente en cajas hasta cumplir las 12 semanas de edad. Los ratones pertenecientes al grupo control fueron alojados en grupos de 4 o 5 hasta cumplir las 12 semanas de edad.

Medición de las conductas tipo ansiedad y depresión.-Para evaluar si los protocolos de estrés utilizados generan conductas tipo ansiedad realizamos la prueba del laberinto de los brazos elevados y la de campo abierto, mientras que para evaluar la conducta tipo depresiva realizamos la prueba del nado forzado.

*La prueba de campo abierto* consiste en exponer a los roedores a un ambiente (arena) desconocido del cual no pueden huir debido a la existencia de paredes que se los impide. El ambiente de exposición es una arena iluminada con un área de 60 x50 cm y 15 cm de altura. Los animales se exponen a la arena durante 5 minutos en los que se video graba para posteriormente evaluar el tiempo acumulado que pasan en el centro

de la caja. Se espera que un animal con altos niveles de ansiedad pase menor tiempo en el centro de la arena, en donde está expuesto, que los ratones no ansiosos<sup>82</sup>.

*El laberinto de los brazos elevados (LBE)* se basa en una respuesta natural aversiva que le genera al ratón explorar un ambiente novedoso o abierto, en donde además no tiene posibilidad de escape. Los ratones se exponen por 10 min a un laberinto elevado en cruz que tiene dos brazos abiertos y dos cerrados. La elevación del laberinto es de 38.5 cm, los brazos tienen una dimensión de 30 cm de largo x 10 cm de ancho<sup>83</sup>. La prueba es videograbada para cuantificar el número de entradas a los brazos abiertos. Se considera que un animal que se arriesga poco a entrar a los brazos abiertos tiene niveles de ansiedad aumentados<sup>83</sup>.

*El nado forzado (NF)* es una prueba que evalúa conductas tipo depresión. En esta prueba los ratones se introducen en un recipiente de aproximadamente 25 cm de alto con 10 cm de diámetro que está lleno a  $\frac{3}{4}$  partes con agua tibia (23°C), durante 10 min. El parámetro medido fue el tiempo acumulativo de inmovilidad que presentan los animales durante un período de 10 minutos. Se considera inmovilidad cuando el ratón deja de luchar y permanece flotando haciendo sólo aquellos movimientos necesarios para mantener su cabeza fuera del agua<sup>84</sup>. Todas las sesiones de prueba fueron grabadas en video para su posterior evaluación.

Estimulación con LPS.-Una vez terminados los protocolos de estrés (cuando los ratones cumplieron las 12 semanas de edad y se realizaron las pruebas conductuales) a los animales se les administró LPS 1 mg/kg o con solución salina (control) por vía intraperitoneal. Una hora después del estímulo con LPS los ratones fueron decapitados, se recolectó la sangre troncal y se realizó un lavado peritoneal.

Lavado peritoneal y cuantificación del TNF.- Se realizaron lavados peritoneales mediante la inyección de 2 ml de solución salina estéril en la cavidad peritoneal. La inyección fue seguida por un masaje suave en la cavidad peritoneal y la solución salina (aproximadamente 1 mL) fue recuperada con una jeringa estéril después de exponer el

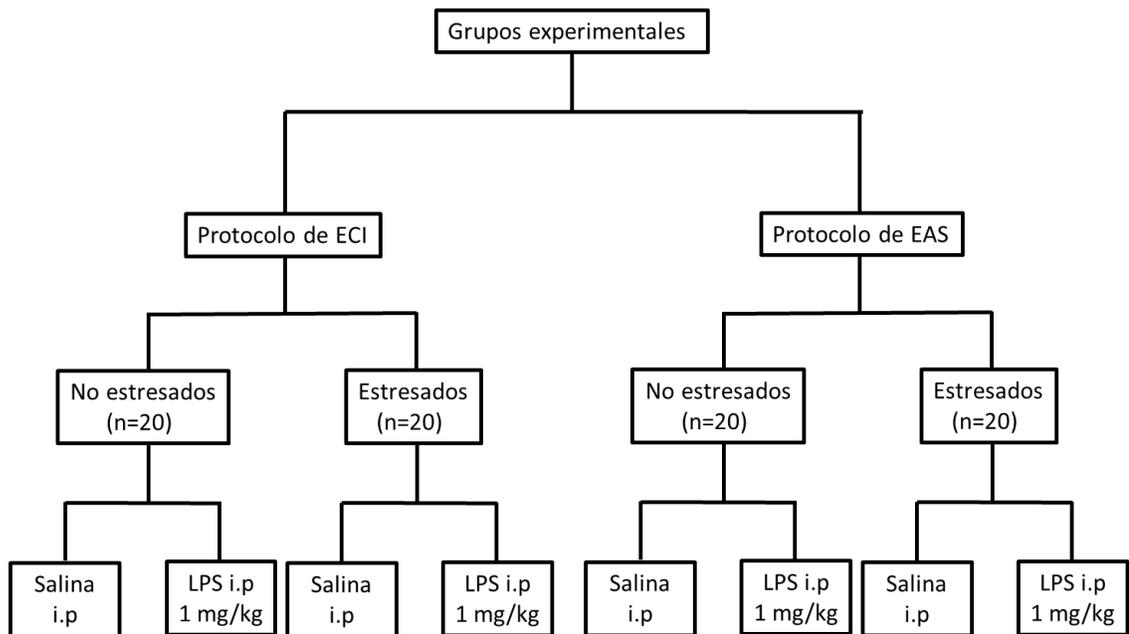
peritoneo. Los lavados peritoneales se centrifugaron a 10500 x g durante 5 minutos y los sobrenadantes, libres de células, se mantuvieron a -70° C para la posterior cuantificación de TNF utilizando un kit de ELISA específico siguiendo las instrucciones del proveedor (PreproTech, 900 - K126).

Medición de corticosterona y vasopresina.-La sangre troncal recolectada 1 hora después del estímulo con LPS fue centrifugada 15 minutos a 14000 rpm (4°C) para separar el plasma del cual se almacenaron dos alícuotas a - 80°C para medir la cantidad de corticosterona y de vasopresina mediante la técnica de ELISA de acuerdo a las instrucciones de los kits (Corticosterone EIA Kit, ENZO Life Sciences, # catálogo ADI-900-097 y Arg-Vasopressin EIA Kit, ENZO Life Sciences, # catálogo ADI-901-017).

Estadística.- Las diferencias entre dos grupos fueron evaluadas mediante la prueba de *Student Neuman-Keuls*. Con la finalidad de determinar diferencias entre los tratamientos de un mismo grupo los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía, para determinar la diferencia entre tratamientos de grupos independientes se realizó un ANOVA de dos vías, posteriormente las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Tukey. En todos los casos se consideró una  $*P \leq 0.05$  como significativa.

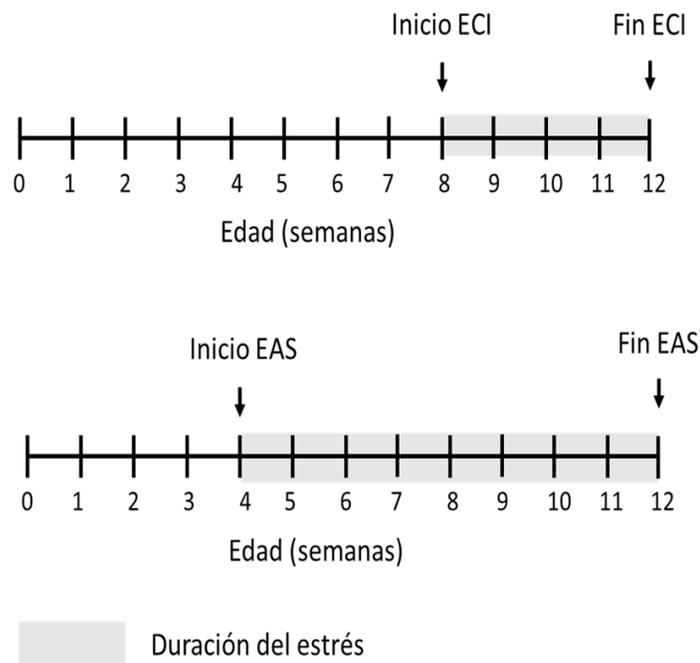
## Diseño experimental

Los protocolos de estrés crónico se realizaron utilizando grupos experimentales independientes de acuerdo a lo indicado en el siguiente diagrama.



### Cronología de los experimentos

El protocolo de estrés crónico impredecible (ECI) comenzó cuando los ratones cumplieron las 8 semanas de edad, mientras que el protocolo de estrés por aislamiento social (EAS) comenzó cuando los ratones cumplieron 4 semanas de edad, en ambos casos la exposición a los estresores termino a las 12 semanas posnatales (PN), ver esquema I.



Esquema I. Duración de los protocolos de estrés crónico.

Los 5 días siguientes al término de los protocolos de estrés fueron sometidos a las pruebas conductuales y sacrificados para la toma de muestras biológicas de acuerdo a lo indicado en la tabla 4.

<b>Día post-estrés</b>	<b>Prueba / tratamiento</b>	
1	Campo abierto Laberinto de los brazos elevados	
2	Nado forzado	
3 y 4	Sin prueba	
5	Administración i.p LPS (1 mg/kg)	Solución salina i.p
	(1 h después) Sacrificio de animales y toma de lavados peritoneales y sangre troncal para las mediciones de TNF, corticosterona y vasopresina.	

Tabla 4. Organización temporal para la realización de las pruebas conductuales y la administración de LPS.

## Resultados

### 1. Evaluación de la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS en ratones sometidos a dos diferentes modelos de estrés crónico.

Como se muestra en la figura 24A, la administración de LPS indujo un incremento la secreción peritoneal de TNF proveniente de las células cebadas de la cavidad peritoneal (barras negras). Esta respuesta se incrementó significativamente al someter a los ratones al protocolo de ECI (de 413.29 pg/mL a 583.10 pg/mL, ANOVA de una vía F<sub>(3,103)</sub>=33.68 P<0.001). Sin embargo, en el modelo de estrés crónico por aislamiento al evaluar la misma respuesta la secreción de TNF disminuyó de 423.57 pg/mL a 214.11 pg/mL (ANOVA de una vía F<sub>(3,31)</sub>=21.74, P<0.001), figura 24B.

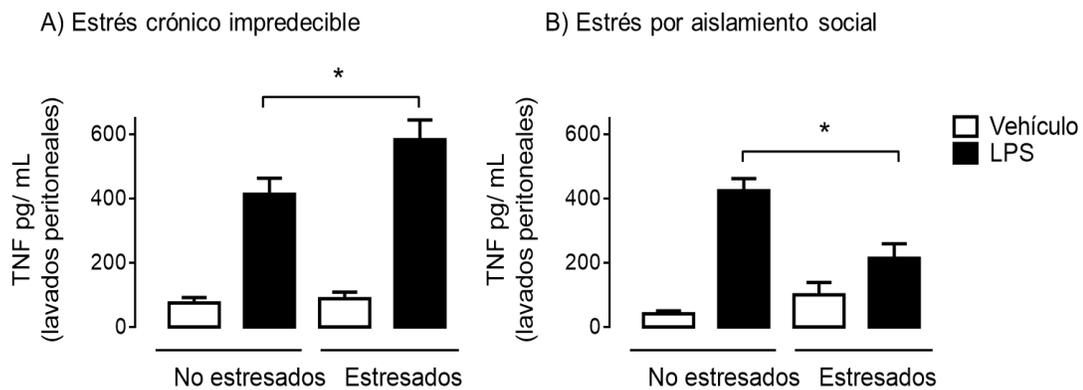


Figura 24. Efecto del estrés crónico ligero impredecible y por aislamiento social sobre la secreción de TNF inducida por LPS en las células cebadas de la cavidad peritoneal. Cuantificación de TNF en los lavados peritoneales de ratones SW sometidos al modelo de estrés crónico impredecible (panel A) y al modelo de estrés por aislamiento social (panel B). Prueba de Tukey \*P<0.05.

## 2. Evaluación de la secreción de corticosterona y vasopresina en respuesta al tratamiento con LPS en ratones sometidos a estrés crónico.

Los resultados muestran que los ratones estresados crónicamente no tienen cambios en las concentraciones basales de corticosterona (barras blancas de la figura 25), pero el estímulo con LPS incrementó la secreción plasmática de la hormona ( $F_{(3,26)}=41.53$ ,  $P<0.001$  para el panel A y  $F_{(3,26)}=33.65$ ,  $P<0.001$  para el panel B), efectos que ya han sido reportados en esta cepa en estudios previos del laboratorio<sup>8</sup>. Sin embargo, la exposición al estrés crónico no modificó el incremento en la secreción de corticosterona inducido por el LPS en ambos modelos utilizados.

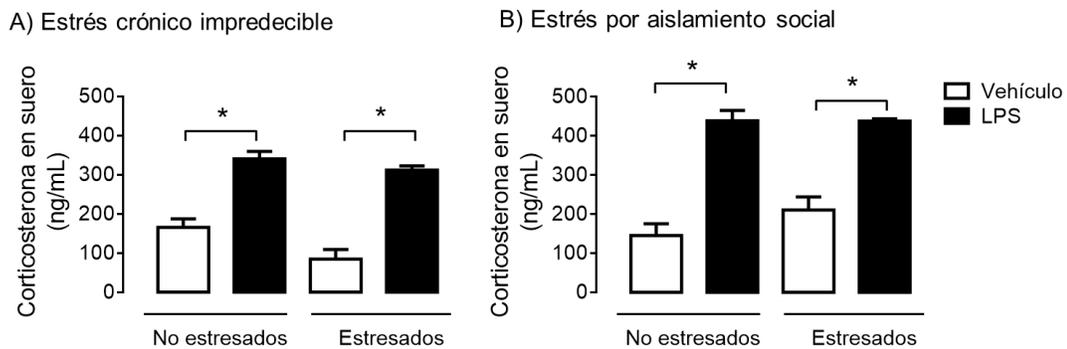


Figura 25. Efecto del estrés crónico impredecible y del estrés por aislamiento social sobre la producción de corticosterona en respuesta al LPS. Cuantificación de corticosterona en el suero de ratones SW después de sometidos al modelo de crónico impredecible (panel A) y al modelo de estrés por aislamiento social (panel B). Prueba de comparaciones múltiples de Tukey \* $P<0.05$ ,  $n=6$ .

De la misma manera que con la corticosterona, los niveles en suero de vasopresina no cambiaron tras la exposición al estrés crónico en los ratones SW (barras blancas de la figura 26). Además, la administración intraperitoneal de LPS tampoco modificó las concentraciones de vasopresina en suero en los ratones no sometidos a estrés, pero la exposición crónica al estrés (en ambos protocolos) provocó que el LPS incrementara considerablemente las concentraciones de vasopresina ( $F_{(3,24)} = 6.33$ ,  $P=0.0019$  para el panel A y  $F_{(3,28)} = 8.5$ ,  $P=0.0003$  para el panel B de la figura 26).

A) Estrés crónico impredecible

B) Estrés por aislamiento social

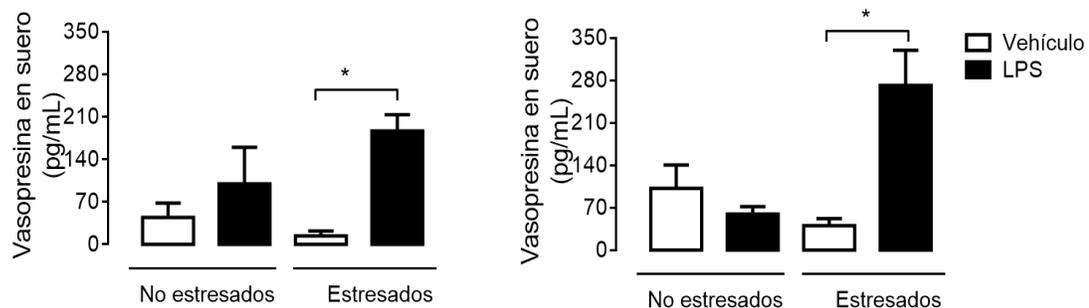


Figura 26. Efecto del estrés crónico en los niveles de vasopresina en suero es respuesta al LPS. Medición de los niveles de vasopresina en suero de ratones sometidos al modelo de estrés crónico ligero (panel A) o al modelo de estrés por aislamiento social (panel B). Prueba de comparaciones múltiples de Tukey \* $P<0.05$ ,  $n=6$ .

### 3. Caracterización de las conductas tipo ansiedad y tipo depresión en los ratones SW después de ser sometidos a estrés crónico.

Diversos estudios han propuesto que el estrés favorece el desarrollo de trastornos psiquiátricos, tales como la ansiedad y la depresión. Sin embargo, la cepa SW no ha sido utilizada para la evaluación de los efectos del estrés crónico en la aparición de dichas conductas.

El modelo de ECI se ha reportado que induce conductas tipo depresión, caracterizadas principalmente por la anhedonia observada durante la prueba del agua azucarada, en donde los animales estresados crónicamente disminuyen la preferencia natural que tienen por el agua dulce<sup>78</sup>. Nosotros realizamos la prueba del nado forzado al finalizar ambos protocolos de estrés para evaluar la conducta depresión, observada como una disminución en el tiempo de inmovilidad durante la prueba. Nuestros resultados muestran que solamente el modelo de ECI provoco un incremento en el tiempo acumulado de inmovilidad en comparación con los animales no estresados (figura 27).

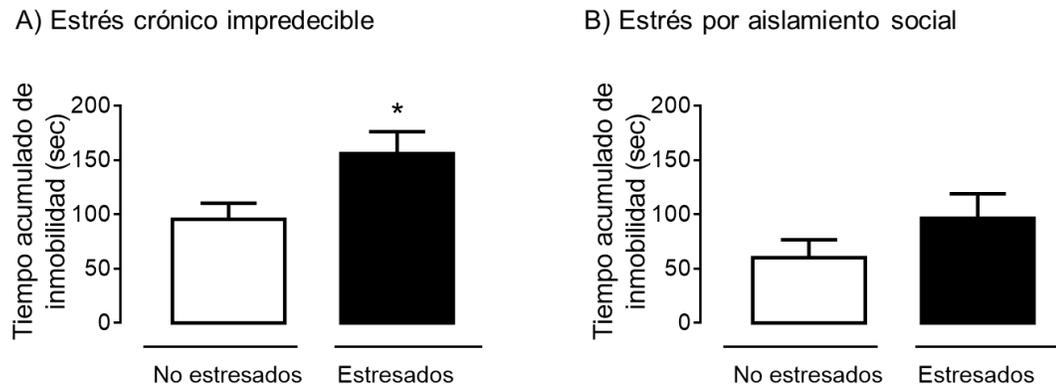


Figura 27. Evaluación del tiempo acumulado de inmovilidad en la prueba de nado forzado en ratones sometidos a estrés crónico ligero (panel A) o estrés por aislamiento social (panel B). Prueba de t \* $P < 0.05$ .

En cuanto a las conductas tipo ansiedad en la prueba de campo abierto, el estrés por aislamiento social disminuyó el tiempo acumulado en el centro de la caja (figura 28B), mientras que el estrés crónico impredecible no modificó la conducta en comparación con los animales no estresados (figura 28A). Sin embargo, en la prueba del laberinto

de brazos elevados los ratones expuestos al modelo de ECI mostraron una disminución del 50% en el número de entradas a los brazos abiertos (figura 29A) mientras que el estrés por aislamiento social no provocó cambios en ese parámetro (figura 29B).

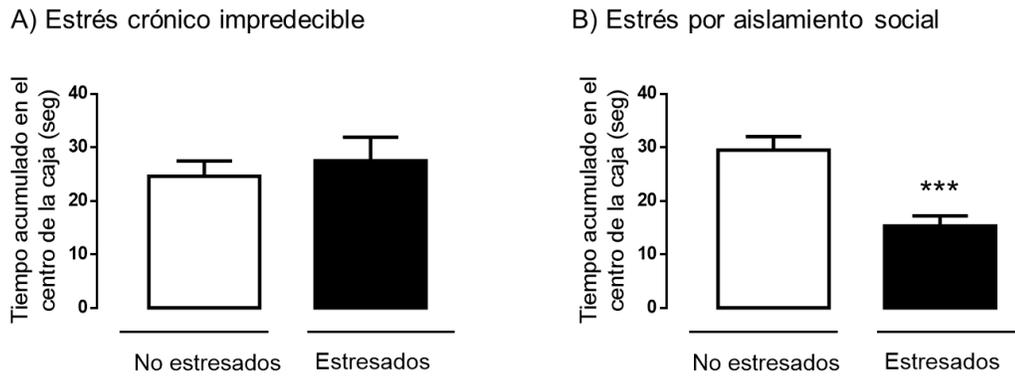


Figura 28. Evaluación del tiempo acumulado en el centro de la caja durante la prueba de campo abierto en ratones sometidos a estrés crónico impredecible (panel A) o a estrés por aislamiento social (panel B), prueba de t  $***P < 0.001$ ,  $n = 10$ .

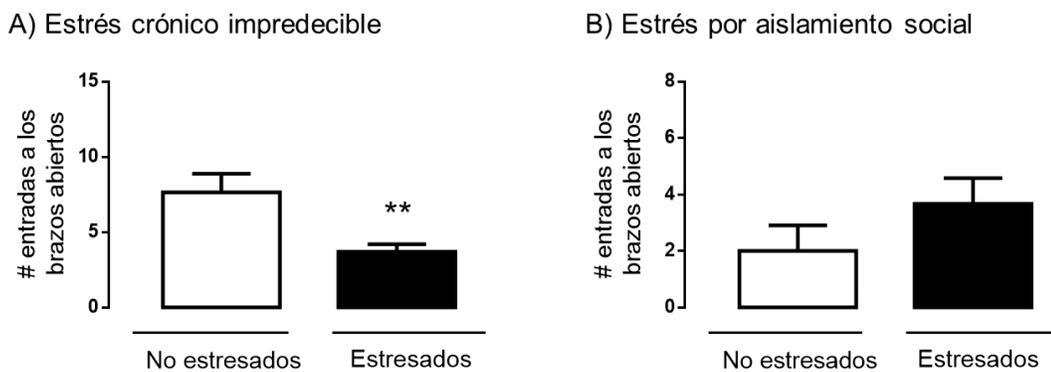


Figura 29. Efectos del estrés en la conducta tipo ansiedad en laberinto elevado en cruz en ratones sometidos al modelo de estrés crónico impredecible (panel A) y al de estrés por aislamiento social (panel B). Las gráficas muestran los valores de la media  $\pm$  la desviación estándar del error del el número de entradas a los brazos abiertos de los 10 animales evaluados. Prueba de t  $**P < 0.01$ .

## Discusión

Se ha demostrado que el estrés crónico desregula la función inmune y se cree que juega un papel en la etiología de muchas enfermedades<sup>1</sup>. Las células cebadas son importantes moduladores de las respuestas inmunes innatas y el papel del estrés sobre la modulación de éstas ha sido poco explorado.

En este trabajo decidimos utilizar dos protocolos de estrés crónico para evaluar su efecto sobre la secreción de TNF dependiente de las células cebadas de la cavidad peritoneal en ratones SW tratados con endotoxina. El modelo de estrés crónico impredecible fue elegido dado que mimetiza en cierta manera la situación de estrés crónico a la que están sometidos los individuos que habitan las grandes urbes (diferentes estresores ligeros de manera intermitente durante periodos largos de tiempo). A pesar de que este modelo de estrés ha sido utilizado principalmente para el entendimiento de la depresión y el tamizaje de fármacos antidepresivos<sup>78</sup>, existe evidencia de que el ECI durante 28 días modifica la respuesta inflamatoria desencadenada por la endotoxina, incrementando los niveles de mediadores inflamatorios como el TNF y la IL-1 en el hipocampo y en el cerebro medio<sup>85</sup>. Este antecedente sugiere que el estrés crónico impredecible tiene efectos pro-inflamatorios, dato que coincide con nuestros resultados, en donde este tipo de estrés incrementó la secreción de TNF peritoneal dependiente de las células cebadas en respuesta al LPS. Otros estudios han encontrado que el estrés crónico impredecible, por sí mismo, incrementa las concentraciones plasmáticas de TNF<sup>86,87,88</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio el estrés crónico no modificó los niveles basales de TNF en la cavidad peritoneal y tampoco en plasma (anexo 1). Las diferencias entre los resultados obtenidos por otros grupos y los nuestros pueden deberse a la cepa y la edad de los ratones utilizados, en el estudio de Kumar (2011), por ejemplo, utilizan ratones Laca en donde las mediciones de TNF se realizaron a los cuatro meses de edad de los animales<sup>86</sup>.

Por otra parte, el modelo de estrés por aislamiento social fue elegido dado que sus efectos sobre la respuesta inmune, en general, han sido poco explorados y resulta

importante evaluarlos dado que se ha reportado que este tipo de estrés induce cambios drásticos en la conducta y la estructura cerebral en los roedores<sup>80</sup>. Uno de los pocos estudios que asocia al estrés por aislamiento social con la respuesta inmunológica indica que este tipo de estrés, iniciado después del destete y con una duración de 28 días, disminuyó significativamente el número de tumores en los ratones que sobrevivían al modelo de adenocarcinoma mamario, comparado con los ratones no estresados<sup>89</sup>. Es decir, el estrés por aislamiento social mostraba efectos inmuno-protectores. A pesar de que en ese trabajo se evaluaron respuestas inmunológicas adaptativas, y por lo tanto es difícil de comparar con nuestros resultados, es importante destacar que en la secreción de TNF inducida por un estímulo de la inmunidad innata, como lo es el LPS, el estrés por aislamiento social también tuvo efectos antiinflamatorios (figura 24, panel B). Por otra parte, sabemos que el estrés agudo por nado forzado tiene efectos inmunosupresores sobre la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS en las células cebadas, vía la activación del reflejo antiinflamatorio colinérgico<sup>8</sup>. Así, sería importante evaluar, en futuros experimentos, si los efectos inmunosupresores encontrados en el modelo de EAS sobre la secreción de TNF están controlados por el nervio vago a través de la activación de los nAChR $\alpha$ 7 en las células cebadas de la cavidad peritoneal.

En conjunto, nuestros resultados muestran que el modelo de ECI incrementó la secreción peritoneal de TNF en la cavidad peritoneal de ratones tratados con LPS, mientras que el modelo de EAS tuvo el efecto contrario. Las diferencias observadas en la secreción de TNF sugieren que el tipo de estresor es determinante para modular la respuesta inmunológica.

Otra parte importante de este estudio se centró en evaluar la secreción de corticosterona y vasopresina en respuesta al LPS como parte de la caracterización de los modelos de estrés crónico que utilizamos.

La secreción de corticosterona tras la exposición al estrés agudo ha sido reportada en múltiples modelos, por ejemplo el nado forzado y la restricción de movimiento<sup>8,90</sup>. En donde el incremento en plasma de esta hormona se observó a partir de los 5 min post-estrés. Sin embargo, cambios en la secreción de corticosterona después de la exposición

crónica al estrés no son del todo claros. Mientras algunos estudios demuestran que no hay cambios significativos al finalizar el estrés crónico impredecible, como lo muestran nuestros resultados, otros estudios demuestran un incremento significativo en la secreción plasmática de este mediador <sup>91,92,93,94</sup>.

En cuanto a la vasopresina se ha descrito que el RNAm de esta hormona incrementan después de la exposición crónica al estrés en el núcleo paraventricular del hipotálamo<sup>95,96</sup>. Por otro lado no hay trabajos que evalúen las concentraciones plasmáticas de esta hormona en respuesta al estrés crónico. Se han hecho mediciones indirectas evaluando las concentraciones plasmáticas de ACTH (hormona adrenocorticotropica), hormona que es producida en la hipófisis en respuesta a la producción de vasopresina y CRH (hormona liberadora de corticotropina)<sup>97</sup>. En otro estudio en ratones se reportó que las concentraciones plasmáticas de ACTH se incrementaron considerablemente por la exposición a estrés agudo por restricción (durante 30 minutos) pero no se modificaron después de 13 días de exposición a este estresor <sup>98</sup>. Este resultado es similar a los obtenidos con los modelos de estrés crónico utilizados en este proyecto. Así, podríamos sugerir que los niveles plasmáticos de corticosterona y de vasopresina no son parámetros bioquímicos indicativos del estrés crónico, por lo menos no bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Por otro lado, se ha detectado que en modelos de sepsis, como la ligación del ciego y punción (CLP) incrementan las concentraciones plasmáticas de vasopresina (seis horas después de la CLP)<sup>99</sup>. Los resultados de nuestro trabajo muestran que en los ratones que fueron expuestos a estrés crónico y recibieron un reto con LPS, las concentraciones plasmáticas de vasopresina se incrementaron, cosa que no ocurrió en los ratones no estresados. Este resultado sugiere que el estrés crónico podría estar sensibilizando la actividad del eje HHA y, por lo tanto, promover una rápida secreción de vasopresina en respuesta al LPS. Sin embargo, es necesario ampliar los experimentos al respecto, para evaluar la temporalidad en la que el LPS induce el incremento en la secreción plasmática de vasopresina en la cepa de ratones utilizada. Esto, debido a que en condiciones normales (sin estrés) no observamos incremento de vasopresina en respuesta al LPS (1 hora después de la administración de la endotoxina).

Con respecto a la inflamación, numerosos estudios han enfocado los efectos de la vasopresina en el shock séptico.

Los efectos de la vasopresina en la inflamación son controversiales. Vía los receptores  $V_2$  la vasopresina disminuye la respuesta inflamatoria durante la uropatogénesis causada por *Escherichia coli*<sup>100</sup>. También se ha encontrado que bajo la estimulación de los receptores  $V_2$  la AVP disminuye la secreción de IL-6 en la inflamación pulmonar establecida por LPS<sup>101</sup>. En contraste, los receptores  $V_1$  al parecer tienen un efecto pro-inflamatorio y han sido encontrados en células mononucleares periféricas<sup>101</sup>, bajo la activación de estos receptores se induce la producción de  $INF\gamma$  en linfocitos T. Un estudio reciente reportó que la vasopresina tiene un papel pro-inflamatorio en un modelo de colitis experimental en roedores. En este estudio el uso de un antagonista para el receptor  $V_1$  disminuye la producción de TNF en el tejido (colon) inducida por DNBS (2,4 dinitrobenzeno ácido sulfuroso) que es un inductor de colitis en ratas. En este estudio se tenía la hipótesis de que el DNBS podría estar activando a las células cebadas en el colon, promoviendo el daño al tejido, para probarlo utilizaron un estabilizador de las células cebadas (cromoglicato de sodio) y encontraron que el daño y la permeabilidad en el colon disminuía aun en presencia de la vasopresina<sup>102</sup>. Los resultados descritos previamente junto con los obtenidos en nuestro estudio nos hacen pensar que la vasopresina incrementa en respuesta a estímulos de la inmunidad innata bajo condiciones de estrés. Esta hormona pueden activar a las células cebadas (en el tracto gastrointestinal y en la cavidad peritoneal) promoviendo la inflamación, probablemente a través de la activación de los receptores  $VR_1$ . Utilizando los modelos de estrés crónico caracterizados en nuestros estudios se podrían hacer futuras investigaciones al respecto.

Finalmente, el estrés crónico se ha asociado con la aparición de trastornos psiquiátricos como la ansiedad y la depresión. En particular, el modelo de estrés crónico impredecible se utiliza para identificar fármacos con propiedades antidepresivas. Estas propiedades se establecen mediante la prueba del consumo de agua azucarada, prueba basada en la preferencia natural de los roedores para consumir agua dulce. Esta preferencia es disminuida (conducta de anhedonia) tras el tratamiento de estrés durante

todas las semanas que dura la exposición al estresor. Nosotros realizamos la prueba del consumo de agua azucarada de manera semanal durante el protocolo de estrés crónico impredecible y encontramos que en los ratones SW el consumo de agua azucarada solo disminuyó durante las 2 primeras semanas de estrés (anexo 2). Existe evidencia de que la disminución del consumo de agua azucarada en el modelo de estrés crónico impredecible varía dependiendo de la cepa de ratones utilizada. Por ejemplo, los ratones de las cepas CBA/H y C57BL/6 muestran una disminución en el consumo de agua azucarada durante las primeras 7 semanas de ECI, mientras que en los ratones de la cepa DBA/2 el consumo de agua azucarada no disminuye durante un periodo de estrés igual<sup>78</sup>. Probablemente la cepa SW es menos susceptible a presentar la conducta de anhedonia en respuesta al estrés. Además, es una cepa que se ha utilizado poco para evaluar los efectos crónicos del estrés sobre la conducta, la respuesta inmune y los cambios bioquímicos. Por otro lado, la prueba del nado forzado en animales sometidos a ECI incremento la inmovilidad en ratones SW, dato que apoya la idea de que el ECI genera conductas tipo depresión.

Adicionalmente, evaluamos los efectos del ECI en ratones C57BL/6J durante las pruebas del consumo de agua azucarada y del nado forzado (anexo 2 y 3). En ambas pruebas los ratones C57BL/6J muestran mayor susceptibilidad al desarrollo de las conductas tipo depresión que los ratones SW, dado que la disminución del consumo de agua azucarada duro 4 semanas y el tiempo acumulado de inmovilidad de 2 veces mayor.

Las conductas tipo ansiedad en el modelo de ECI sólo se observó en la prueba del campo abierto, mientras que en el modelo de EAS sólo fue detectada en la prueba del laberinto elevado. En general, el aislamiento social es utilizado para inducir conductas tipo ansiedad en roedores<sup>80,84</sup>. Sin embargo, los protocolos de aislamiento social son variados; los animales pueden ser sometidos al aislamiento inmediatamente después del destete o semanas después del mismo. Es probable que las diferencias encontradas, respecto a las conductas tipo ansiedad desarrolladas después de la exposición crónica en los dos modelos de estrés, se deban a las cepas de ratones utilizadas, contrastando los resultados con los obtenidos por otros grupos de investigación y por los observados

en los ratones C57BL7/6J (anexo 3), por lo que es necesario profundizar en los experimentos realizados para poder concluir los motivos por los que el fondo genético de los animales utilizados afecta la aparición de las conductas tipo ansiedad.

Los ratones SW sometidos a estrés crónico desarrollan conductas tipo ansiedad y depresión pero en niveles menores que otras cepas utilizadas comúnmente en modelos de estrés (como la C57BL/6J). Probablemente la baja susceptibilidad de los ratones SW al desarrollo de dichas conductas limite su uso en los modelos de estrés usados para evaluar los procesos neurobiológicos que subyacen a estas conductas.

## Conclusiones

El estrés crónico modula la secreción de TNF dependiente de las células cebadas de la cavidad peritoneal tras la estimulación con LPS. Dependiendo del tipo de estresor aplicado crónicamente la modulación de la respuesta inmune puede ser positiva o negativa. El ECI incrementa la secreción de TNF inducida por LPS, mientras que el estrés por aislamiento social la disminuye.

Los niveles en suero de corticosterona no son un marcador de estrés crónico ya que la secreción de esta hormona no fue modificada en condiciones basales después de la exposición crónica al estrés. Sin embargo, podemos inferir que el eje HHA funciona de manera normal, debido a que el estímulo con LPS incrementa la secreción de esta hormona en plasma de manera similar a la inducida por un estresor agudo como el nado forzado.

Los niveles de vasopresina no fueron modificados en respuesta al estrés crónico en ninguno de los modelos utilizados pero el incremento en la secreción de esta hormona, por el estímulo con LPS, sugiere que la vasopresina puede jugar un papel importante en la modulación de la respuesta inmune innata en las células cebadas. La vasopresina está asociada a respuestas pro-inflamatorias en las células cebadas en modelos de inflamación *in vivo*<sup>102</sup>, lo que convierte a este mediador en posible responsable de los efectos estimuladores en la secreción de TNF inducida por LPS después de la exposición al modelo de EAS.

Finalmente, durante el ECI observamos que el estímulo con LPS previno la secreción peritoneal de TNF, este efecto es similar al observado durante el estrés agudo por nado forzado reportado en estudios previos del laboratorio. En la primera sección de esta tesis confirmamos que el reflejo antiinflamatorio colinérgico a través de la activación de los receptores nAChR7 tiene efectos inhibidores sobre la vía del receptor TLR-4 que llevan a la secreción de TNF. Por esta razón es importante, para futuros estudios, evaluar si en respuesta al ECI se activa el nervio vago, y la acetilcolina liberada tiene los mismos efectos antiinflamatorios sobre las células cebadas como sucede durante el estrés agudo.

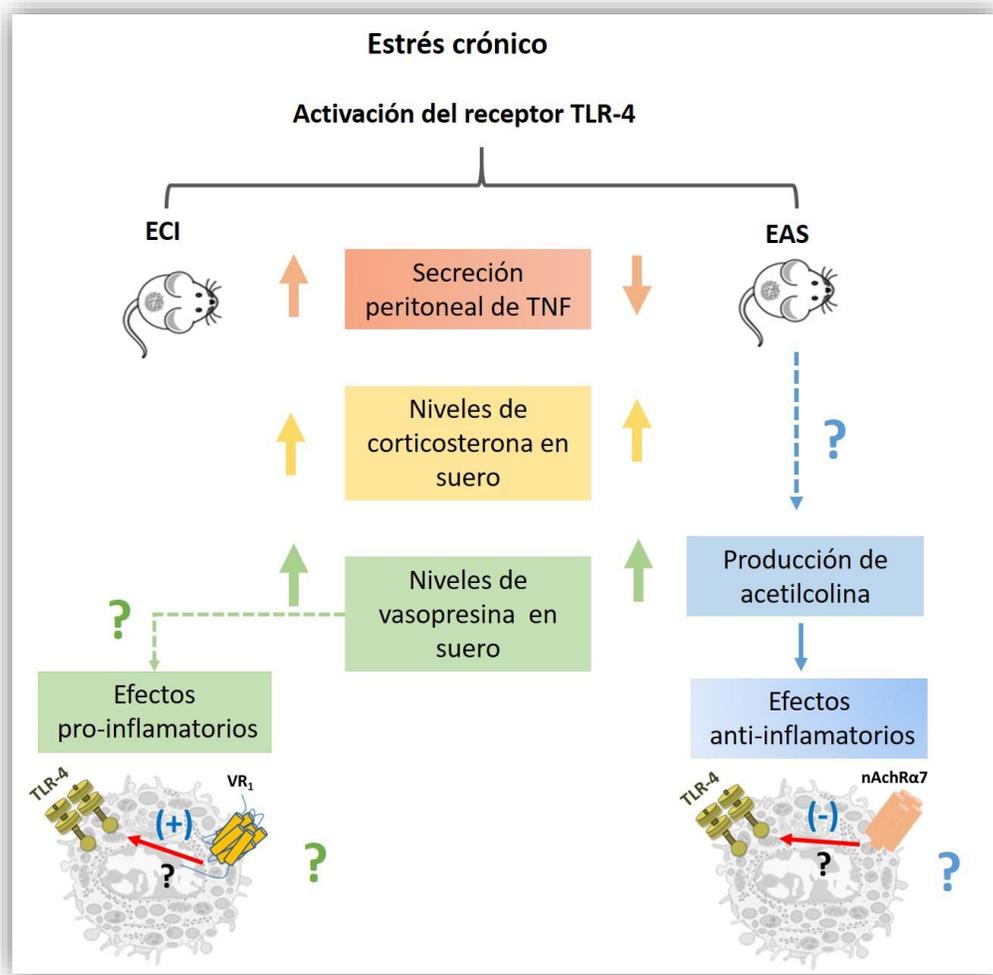


Figura 30. Modulación de la respuesta inmune innata por acción de los mediadores del estrés crónico. El ECI incrementa (↑) la secreción de TNF inducida por LPS, mientras que el estrés por aislamiento social la disminuye (↓). El estímulo LPS incrementa la secreción de corticosterona (↑) y vasopresina en suero (↑). La vasopresina está asociada a respuestas pro-inflamatorias en las células cebadas en modelos de inflamación *in vivo* pero se desconoce su papel sobre este tipo celular en respuesta al estrés crónico. Posiblemente en respuesta al ECI se activa el nervio vago, y la acetilcolina liberada (↑) tiene los mismos efectos antiinflamatorios sobre las células cebadas como sucede durante el estrés agudo.

## CONCLUSIONES GENERALES

Las aproximaciones experimentales realizadas en este trabajo permitieron evaluar los efectos que el estrés agudo y el crónico ejercen sobre la respuesta inmune innata dependiente de las células cebadas, *in vivo* e *in vitro* (figura 31).

Por una parte, en un modelo *in vitro*, se logró caracterizar el mecanismo molecular desencadenado por el reflejo antiinflamatorio colinérgico (por acción de los receptores nicotínicos  $\alpha 7$ ), en respuesta al estrés agudo por nado forzado (NF), para inhibir la secreción de TNF estimulada por el LPS.

Finalmente, se lograron desarrollar dos modelos de estrés crónico que modulan de manera diferencial la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS (dependiente de las células cebadas). Los modelos de estrés crónico ligero (ECI) y de estrés por aislamiento social (EAS) pueden ser utilizados en estudios posteriores para identificar a los mediadores neuroendocrinos (posiblemente vasopresina o acetilcolina) que afectan la vía de señalización del receptor TLR-4 en las células cebadas, así como los mecanismos moleculares implicados.

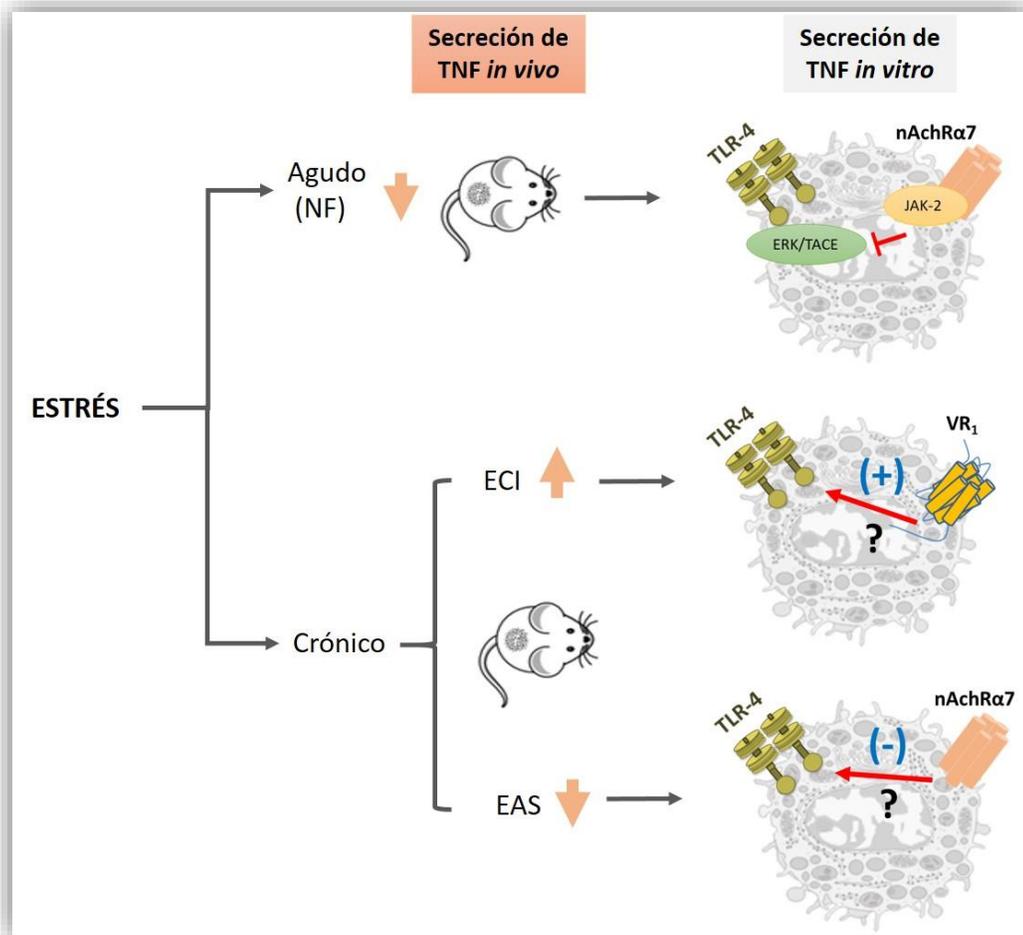


Figura 31. Efectos del estrés en la secreción de TNF inducida por LPS en células cebadas, aproximaciones *in vivo* e *in vitro*. El estrés agudo por nado forzado (NF) inhibe la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS dependiente de las células cebadas de la cavidad peritoneal (↓), este efecto está mediado por el reflejo antiinflamatorio colinérgico a través de la activación de los receptores nicotínicos. El estrés crónico tiene efectos contrarios sobre la misma respuesta inmune evaluada en las células cebadas, el ECI incrementa (↑) la secreción de TNF mientras que el EAS la disminuye (↓). Los mediadores del estrés, acetilcolina y vasopresina, podrían estar implicados en la modulación de la vía de señalización del receptor TLR-4 que llevan a la secreción de TNF.

## PERSPECTIVAS

### In vitro (en el modelo de BMDCs)

La realización de esta tesis contestó algunas de las preguntas iniciales sobre los mecanismos moleculares mediante las cuales el reflejo antiinflamatorio colinérgico provoca la disminución en la secreción de TNF inducida por LPS en células cebadas. Sin embargo, los resultados obtenidos también han dejado al descubierto puntos en la vía de señalización de los receptores TLR-4 y del nAChR $\alpha$ 7 que no están del todo caracterizados y afectan la secreción de citocinas preformadas en las células cebadas. Así, resulta de gran interés profundizar en investigaciones posteriores en los siguientes puntos:

- 1.- Caracterizar las moléculas que activan el nodo ERK-TACE río arriba en la vía del receptor TLR-4 en células cebadas.
- 2.- Averiguar si otras MAPK activadas por el LPS, como P38 y JNK son afectadas por la estimulación del nAChR $\alpha$ 7 y si tienen impacto sobre la actividad de la TACE.
- 3.- Dado que los efectos inhibidores de la activación del nAChR $\alpha$ 7 sobre la vía del receptor TLR-4 no fueron prevenidos en su totalidad por el inhibidor de JAK-2 (AG490) sería adecuado averiguar otros mecanismos río abajo del nAChR $\alpha$ 7 que afecten la vía del TLR-4.

### In vivo (en los modelos de estrés crónico)

Por otra parte los estudios realizados en los modelos de estrés crónico mostraron que esta condición afecta la secreción de TNF inducida por LPS en las células cebadas, pero dejan algunas interrogantes motivo de futuros estudios, por ejemplo:

- 1.- Averiguar que característica o mediador secretado durante el estrés crónico impredecible y el estrés por aislamiento social hacen que la respuesta inmune innata, dependiente de las células cebadas, incremente o disminuya.
- 2.- Investigar el papel de la vasopresina durante el estrés crónico en respuesta a estímulos de la inmunidad innata como el LPS.
- 3.- Dado que en el modelo de estrés por aislamiento social se observó una disminución en la secreción de TNF inducida por LPS, resultaría importante evaluar si en este efecto inhibitorio participa la activación del reflejo antiinflamatorio colinérgico, fenómeno que afecta esa respuesta innata en las células cebadas durante el estrés agudo.

## ANEXO 1

### Efecto del estrés crónico sobre las concentraciones plasmáticas de TNF estimuladas por LPS.

En la figura 32 se muestra que ambos protocolos de estrés crónico utilizados no tienen efectos en la secreción plasmática de TNF inducida por LPS. Está reportado que el TNF secretado en plasma a tiempos cortos (las 2 primeras horas) no es dependiente de las células cebadas de la cavidad peritoneal. Este TNF es producido *de novo* por los macrófagos del bazo. Este resultado sugiere que el estrés crónico no tiene efectos, a tiempos cortos, sobre esta respuesta innata dependiente de los macrófagos.

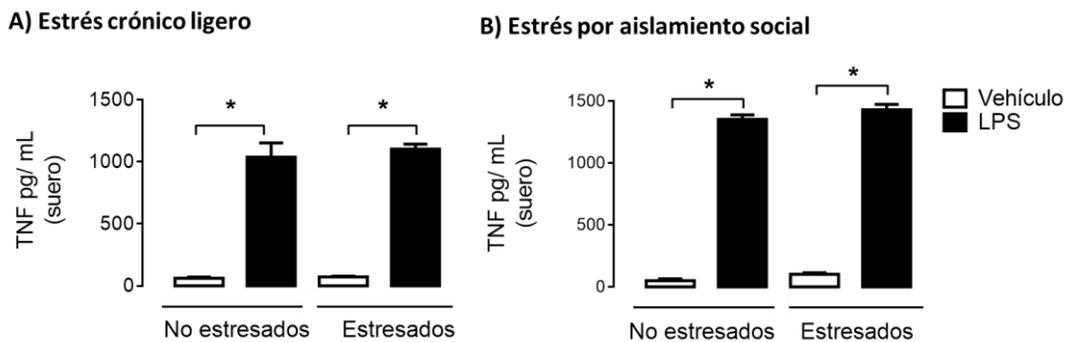


Figura 32. Efecto del estrés crónico sobre las concentraciones plasmáticas de TNF estimuladas por LPS. Concentraciones plasmáticas en suero de ratones SW expuestos al modelo de ECI (panel A) y al modelo de EAS (panel B) bajo las condiciones descritas en el modelo experimental utilizando las mismas muestras de plasma obtenidas para la cuantificación de corticosterona y vasopresina. Prueba de Tukey \*P<0.05, n=10.

**ANEXO 2****Efectos del estrés crónico impredecible sobre el consumo de agua azucarada en ratones SW y C57BL/6J.**

Como se mencionó previamente, el modelo de ECI se utiliza para evaluar conductas tipo depresión y el tamizaje para evaluar fármacos con potencial anti-depresivo utilizando la prueba del consumo de agua azucarada para identificar la conducta de anhedonia. Para ello los animales fueron expuestos a 3 periodos de entrenamiento, cada periodo consistió en alojar a los animales en cajas individuales con libre acceso a alimento. Para evaluar si el protocolo de estrés estaba induciendo la conducta de anhedonia, se realizó una prueba de consumo de agua azucarada una vez a la semana. Para la prueba del consumo de agua azucarada los animales fueron alojados en cajas individuales y se les proporcionaron 2 botellas de agua, una simple y otra azucarada (4% de sacarosa) durante 24h. Para determinar el consumo de agua, las botellas se pesaron antes y después de la prueba. La figura 33 muestra el consumo de agua azucarada como la diferencia de peso de las botellas en gramos (antes y después de la prueba). El grupo control (animales no estresados) se alojó en grupos de 3 y en habitaciones separadas del grupo estresado.

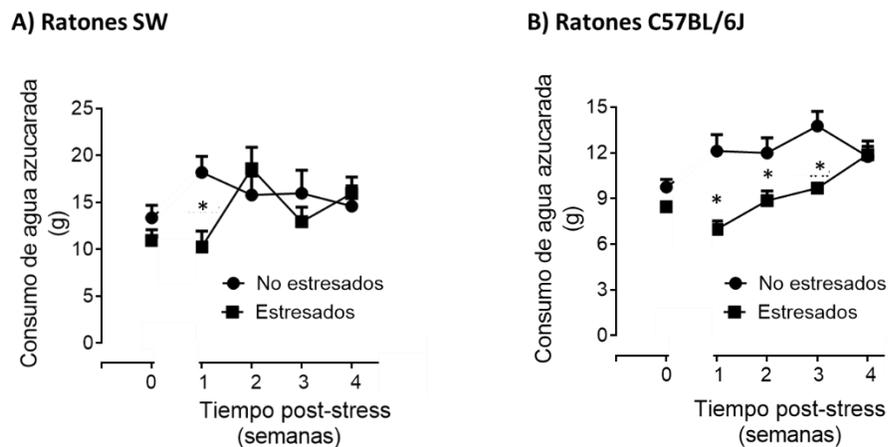


Figura 33. Efectos del estrés crónico impredecible sobre el consumo de agua azucarada en ratones SW (panel A) y C57BL/6J (panel B). Prueba de Tukey \* $P < 0.05$ ,  $n = 10$ .

**ANEXO 3****Evaluación de los efectos del estrés crónico impredecible en ratones C57BL/6J****1. Efecto del ECI sobre la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS**

El modelo de ECI, en ratones C57BL/6J, induce una disminución en la secreción de TNF dependiente de las células cebadas de la cavidad peritoneal en respuesta a la estimulación con LPS (figura 34). Este resultado contrasta con el efecto observado en ratones SW en las que el ECI incrementa la secreción de TNF inducida por LPS (figura 24, panel A), lo que pone de manifiesto que el fondo genético de las cepas influyen en que perciben los estímulos se perciben de manera distinta generando cambios en respuestas evaluadas.

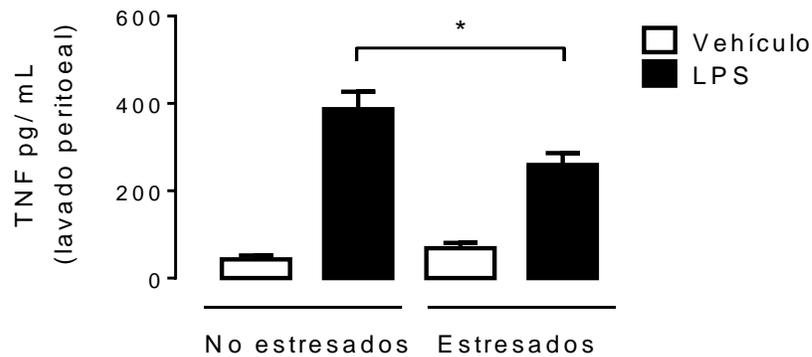


Figura 34. Efecto del ECI en la secreción peritoneal de TNF inducida por LPS. Los ratones C57BL/6J fueron sometidos al mismo protocolo de ECI que los ratones SW. Prueba de Tukey \* $P < 0.05$ .

## 2. Efecto del ECI sobre la secreción de corticosterona inducida por LPS en ratones C57BL/6J.

Como se mencionó en la discusión, los efectos de la exposición crónica al estrés sobre la secreción de corticosterona son poco concluyentes. Nuestros resultados muestran que en las 2 cepas de ratones utilizadas (SW, figura 25 A y C57BL/6, figura 35) los niveles basales de corticosterona no se afectaron tras 4 semanas de estrés. Sin embargo, en los ratones C57BL/6J, sometidos a estrés, el estímulo con LPS indujo una secreción de corticosterona significativamente menor que en los ratones que no tuvieron estrés crónico (de 255 ng/mL a 149.66 ng/mL, ANOVA de una vía  $F_{(3,29)}=19.02$ ,  $P<0.001$ ), efecto que no fue observado en los ratones SW (figura 25, panel A).

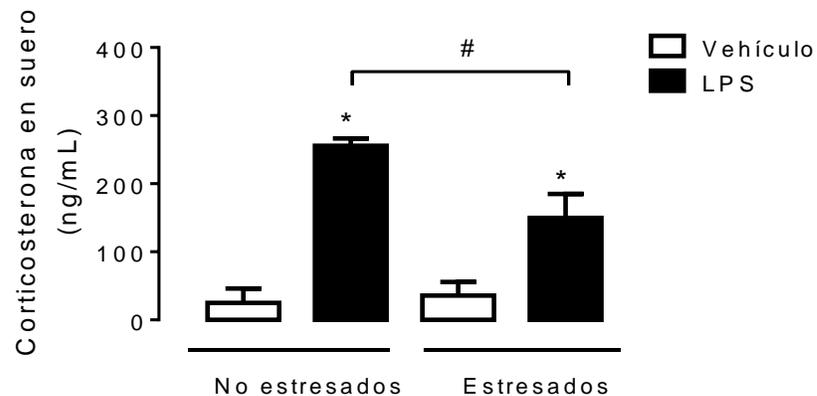


Figura 35. Efecto del ECI sobre la secreción de corticosterona inducida por LPS en ratones C57BL/6J. Los ratones C57BL/6J fueron sometidos al protocolo de ECI de la misma manera que los ratones SW según lo indicado en el modelo experimental. Prueba de Tukey \* $P>0.05$  vs el vehículo en cada tratamiento. # $P<0.05$  vs el grupo no estresado.

### 3. Efecto del ECI sobre el tiempo acumulado de inmovilidad durante la prueba del nado forzado en ratones C57BL/6J

En la figura 36 se observa que durante la prueba del nado forzado los ratones C57BL/6J que fueron expuestos al modelo de ECI muestran un incremento en el tiempo acumulado de inmovilidad, que es dos veces mayor que en los ratones SW (figura 27, panel A). Estos resultados en conjunto con los obtenidos en la prueba del consumo de agua azucarada sugieren que la cepa C57BL/6J es más susceptible a desarrollar conductas tipo depresión en respuesta al ECI.

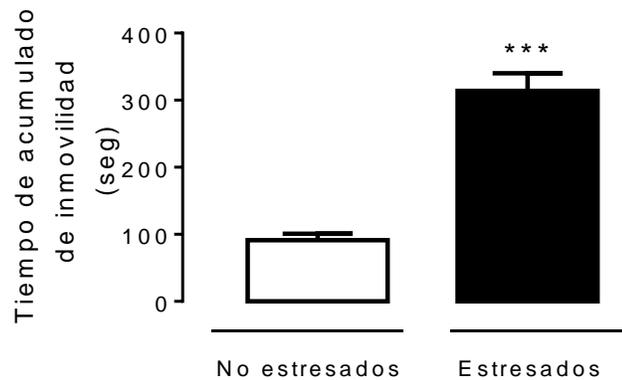


Figura 36. Efecto del ECI en el tiempo acumulado de inmovilidad durante la prueba del nado forzado en ratones C57BL/6J. Los ratones C57NL/6J fueron sometidos al protocolo de ECI de la misma manera que los ratones SW según lo indicado en el modelo experimental. Prueba de t \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 10$ .

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Joëls, M. & Baram, T. Z. The neuro-symphony of stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 459–66 (2009).
2. Dhabhar, F. S. Effects of stress on immune function: The good, the bad, and the beautiful. *Immunol. Res.* 58, 193–210 (2014).
3. Dhabhar, F. S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation* 16, 300–17 (2009).
4. Yvonne, M., Lai, U. & P. Herman, J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, (2009).
5. Kloet, E. R. De, Joëls, M. & Holsboer, F. Stress and the brain : from adaptation to disease. 6, (2005).
6. Chrousos, G. P. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Publ. Gr.* 5, 374–381 (2009).
7. Tracey, K. J. Understanding immunity requires more than immunology. *Nat. Immunol.* 11, 561–4 (2010).
8. Romero-Carbente, J. C., Guzmán-Mejía, F., Cruz, S. L., López-Rubalcava, C. & González-Espinosa, C. Role of main neuroendocrine pathways activated by swim stress on mast cell-dependent peritoneal TNF production after LPS administration in mice. *Inflamm. Res.* 63, 757–767 (2014).
9. Walid Beghdadi et al. Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. *Front. Immunol.* 2, 1–15 (2011).
10. Hundley, T. R. et al. Kit and FcεRI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells. *Blood* 104, 2410–2417 (2004).
11. Galli, S. J., Borregaard, N. & Wynn, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity : macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. IMM* 12, 1035–1044 (2011).
12. Theoharides, T. C. et al. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 21–33 (2012).

13. Rivera, J., Fierro, N. A. & Olivera, A. New Insights on Mast Cell Activation via the High Affinity Receptor for IgE 1. *Adv. Immunol.* 98, 85–120 (2008).
14. John, A. L. S. & Abraham, S. N. Innate Immunity and Its Regulation by Mast Cells. *J. imm* 190, 4458–4463 (2013).
15. Falvo, J. V., Tsytsykova, A. V. & Goldfeld, A. E. Transcriptional control of the TNF Gene. *Curr. Dir. Autoimmun.* 11, 27–60 (2010).
16. Tiwari, N. et al. VAMP-8 segregates mast cell – preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* 111, 3665–3675 (2008).
17. Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L. & Gonzalez-Espinosa, C. Morphine prevents lipopolysaccharide-induced TNF secretion in mast cells blocking I $\kappa$ B kinase activation and SNAP-23 phosphorylation: correlation with the formation of a  $\beta$ -arrestin/TRAF6 complex. *J. Immunol.* 191, 3400–9 (2013).
18. Suzuki, K. & Verma, I. M. Phosphorylation of SNAP-23 by I $\kappa$ B Kinase 2 Regulates Mast Cell Degranulation. *Cell* 134, 485–495 (2008).
19. Sandig, H. & Bulfone-Paus, S. TLR signaling in mast cells: Common and unique features. *Front. Immunol.* 3, 1–13 (2012).
20. Villa, P. et al. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 549–53 (1995).
21. Malaviya, R., Teruo Ikeda, Ross, E. & Abraham, S. N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- $\alpha$ . *Nature* 381, 77–80 (1996).
22. Supajatura, V. et al. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 167, 2250–6 (2001).
23. Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E. & Abraham, S. N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Lett. to Nat.* 77–80 (1996).
24. Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L. & Gonzalez-Espinosa, C. Morphine decreases early peritoneal innate immunity responses in Swiss-Webster and C57BL6/J mice through the inhibition of mast cell TNF- $\alpha$  release. *J. Neuroimmunol.* 232, 101–7 (2011).

25. Echtenacher, B., Männel, D. N. & Hültner, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381, 75–7 (1996).
26. Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L. & Gonzalez-Espinosa, C. Morphine prevents lipopolysaccharide-induced TNF secretion in mast cells blocking I $\kappa$ B kinase activation and SNAP-23 phosphorylation: correlation with the formation of a  $\beta$ -arrestin/TRAF6 complex. *J. Immunol.* 191, 3400–9 (2013).
27. Asadi, S. et al. Substance P (SP) Induces Expression of Functional Corticotropin-Releasing Hormone Receptor-1 (CRHR-1) in Human Mast Cells. *J. Invest. Dermatol.* 132, 324–329 (2011).
28. Asadi, S. & Theoharides, T. C. Corticotropin-releasing hormone and extracellular mitochondria augment IgE-stimulated human mast-cell vascular endothelial growth factor release, which is inhibited by luteolin. *J. Neuroinflammation* 9, 85 (2012).
29. Alysandratos, K.-D. et al. Neurotensin and CRH interactions augment human mast cell activation. *PLoS One* 7, e48934 (2012).
30. Mast, D. et al. Regulation of mediator release from mouse bone marrow-. 2719–2726 (1985).
31. Benhamou, M. et al. Decrease in IgE Fc receptor expression on mouse bone marrow-derived mast cells and inhibition of formation and of hexosaminidase release by dexamethasone. (1986).
32. Graevskaya, E. E., Akhalaya, M. Y. & Goncharenko, E. N. Effects of cold stress and epinephrine on degranulation of peritoneal mast cells in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 131, 333–5 (2001).
33. Gebhardt, T. et al. beta2-Adrenoceptor-mediated suppression of human intestinal mast cell functions is caused by disruption of filamentous actin dynamics. *Eur. J. Immunol.* 35, 1124–1132 (2005).
34. Inagaki, N. et al. Inhibitory mechanisms of beta-adrenoceptor agonists for immunoglobulin E-mediated experimental allergic reactions in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 336, 225–231 (1997).
35. Kageyama-Yahara, N., Suehiro, Y., Yamamoto, T. & Kadowaki, M. IgE-induced degranulation of mucosal mast cells is negatively regulated via nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 321–5 (2008).

36. Singh, L. K., Pang, X., Alexacos, N., Letourneau, R. & Theoharides, T. C. Acute Immobilization Stress Triggers Skin Mast Cell Degranulation via Corticotropin Releasing Hormone, Neurotensin, and Substance P: A Link to Neurogenic Skin Disorders. *239*, 225–239 (1999).
37. Andersson, U. & Tracey, K. J. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J. Exp. Med.* *209*, 1057–68 (2012).
38. Tracey, K. J. Reflex control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 418–28 (2009).
39. Hurst, R., Rollema, H. & Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol. Ther.* *137*, 22–54 (2013).
40. Talwar, S. & Lynch, J. W. Phosphorylation mediated structural and functional changes in pentameric ligand-gated ion channels: Implications for drug discovery. *Int. J. Biochem. cell Biol.* *53*, 218–223 (2014).
41. Karlin, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 102–114 (2002).
42. Taly, A., Corringer, P., Guedin, D. & Lestage, P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2009).
43. Swope, S. L. & Huganir, R. L. Binding of the nicotinic acetylcholine receptor to SH2 domains of Fyn and Fyk protein tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* *269*, 29817–29824 (1994).
44. Borovikova, L. V et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* *405*, 458–462 (2000).
45. Kox, M. et al. GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation. *Biochem. Pharmacol.* *78*, 863–72 (2009).
46. Cedillo, J. L. et al. A New IRAK-M-Mediated Mechanism Implicated in the Anti-Inflammatory Effect of Nicotine via  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors in Human Macrophages. *PLoS One* *9*, 1–12 (2014).
47. Thomsen, M. S. & Mikkelsen, J. D. The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor ligands methyllycaconitine, NS6740 and GTS-21 reduce lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  release from microglia. *J. Neuroimmunol.* *251*, 65–72 (2012).

48. Peña, G. et al. Unphosphorylated STAT3 modulates alpha 7 nicotinic receptor signaling and cytokine production in sepsis. *Eur. J. Immunol.* 40, 2580–9 (2010).
49. Yue, Y. et al. GTS-21 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production in vitro by modulating the Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathway through the  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Int. Immunopharmacol.* 29, 504–512 (2015).
50. Chatterjee, P. K. et al. Nicotinic acetylcholine receptor agonists attenuate septic acute kidney injury in mice by suppressing inflammation and proteasome activity. *PLoS One* 7, (2012).
51. Chatterjee, P. K., Al-Abed, Y., Sherry, B. & Metz, C. N. Cholinergic agonists regulate JAK2/STAT3 signaling to suppress endothelial cell activation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297, C1294–C1306 (2009).
52. Li, T. et al. Activation of Nicotinic Receptors Inhibits TNF- $\alpha$ -Induced Production of Pro-inflammatory Mediators Through the JAK2/ STAT3 Signaling Pathway in Fibroblast-Like Synoviocytes. *Inflammation* 38, 1424–1433 (2015).
53. Chen, C., Grimaldeston, M. A., Tsai, M., Weissman, I. L. & Galli, S. J. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *PNAS* 102, 11408–11413 (2005).
54. Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L. & Gonzalez-Espinosa, C. Morphine decreases early peritoneal innate immunity responses in Swiss-Webster and C57BL6/J mice through the inhibition of mast cell TNF- $\alpha$  release. *J. Neuroimmunol.* 232, 101–107 (2011).
55. Medina-Tamayo, J., Ibarra-Sánchez, A., Padilla-Trejo, A. & González-Espinosa, C. IgE-dependent sensitization increases responsiveness to LPS but does not modify development of endotoxin tolerance in mast cells. *Inflamm. Res.* 60, 19–27 (2011).
56. Charpantier, E.  $\alpha$ 7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Are Negatively Regulated by Tyrosine Phosphorylation and Src-Family Kinases. *J. Neurosci.* 25, 9836–9849 (2005).
57. Martín-Ávila, A. et al. Protein Tyrosine Kinase Fyn Regulates TLR4-Elicited Responses on Mast Cells Controlling the Function of a PP2A-PKC $\alpha/\beta$  Signaling Node Leading to TNF Secretion. *J. Immunol.* 196, 5075–88 (2016).

58. Echtenacher, B., Mannel, D. N. & Hultner, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381, 75–77 (1996).
59. Galli, S. J. & Tsai, M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* 40, 1843–51 (2010).
60. Trivedi, N. H. et al. Mast cells: multitalented facilitators of protection against bacterial pathogens. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9, 129–138 (2013).
61. Nigrovic, P. A. & Lee, D. M. Mast cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 7, 1–11 (2005).
62. Mishra, N. C. et al. Nicotine inhibits Fc epsilon RI-induced cysteinyl leukotrienes and cytokine production without affecting mast cell degranulation through alpha 7/alpha 9/alpha 10-nicotinic receptors. *J. Immunol.* 185, 588–96 (2010).
63. Fullerton, J. N. & Gilroy, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 551–567 (2016).
64. Wu, J. et al. Heteromeric  $\alpha 7\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 562–574 (2016).
65. Borovikova, L. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462 (2000).
66. Kox, M. et al. Effects of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 on the innate immune response in humans. *Shock* 36, 5–11 (2011).
67. Ping-Chang, Y., Peng-Yuan, Z. & Chang-Sheng, W. Lipopolysaccharide Activates Human Mast Cells To Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. *J. Gastroenterol.* 4, 1–10 (2004).
68. Pavlov, V. A. et al. Selective  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis\*. *Crit. Care Med.* 35, 1139–1144 (2007).
69. Sun, Y. et al. MicroRNA-124 mediates the cholinergic anti-inflammatory action through inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines. *Cell Res.* 23, 1270–1283 (2013).
70. Blobel, C. P. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 32–43 (2005).

71. Robertshaw, H. J. & Brennan, F. M. Release of tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) by TNF $\alpha$  cleaving enzyme (TACE) in response to septic stimuli in vitro. *Br. J. Anaesth.* 94, 222–228 (2005).
72. Rousseau, S. et al. TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated macrophages. *J. Cell Sci.* 121, 149–54 (2008).
73. Jonge, W. J. De et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 6, 844–852 (2005).
74. Kox, M. et al. GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation. *Biochem. Pharmacol.* 78, 863–872 (2009).
75. Brown, J. K., Knight, P. A., Wright, S. H., Thornton, E. M. & Miller, H. R. P. Constitutive secretion of the granule chymase mouse mast cell protease-1 and the chemokine, CCL2, by mucosal mast cell homologues. *Clin. Exp. Allergy* 33, 132–141 (2003).
76. Eglite, S., Morin, J. M. & Metzger, H. Synthesis and secretion of monocyte chemotactic protein-1 stimulated by the high affinity receptor for IgE. *J. Immunol.* 170, 2680–7 (2003).
77. Teshima, R., Onose, J., Okunuki, H. & Sawada, J. Effect of Ca(2+) ATPase inhibitors on MCP-1 release from bone marrow-derived mast cells and the involvement of p38 MAP kinase activation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121, 34–43 (2000).
78. Pothion, S., Bizot, J.-C., Trovero, F. & Belzung, C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav. Brain Res.* 155, 135–46 (2004).
79. Barnum, C. J., Pace, T. W. W., Hu, F., Neigh, G. N. & Tansey, M. G. Psychological stress in adolescent and adult mice increases neuroinflammation and attenuates the response to LPS challenge. *J. Neuroinflammation* 9, 9 (2012).
80. Ieraci, A., Mallei, A. & Popoli, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plast.* 2016, (2016).

81. Locci, A., Geoffroy, P., Miesch, M., Pinna, G. & Mascia, M. P. Social Isolation in Early versus Late Adolescent Mice Is Associated with Persistent Behavioral Deficits That Can Be Improved by Neurosteroid-Based Treatment. *11*, 1–11 (2017).
82. Ennaceur, A. & Chazot, P. L. Preclinical animal anxiety research – flaws and prejudices. 1–37 (2016). doi:10.1002/prp2.223
83. Calabrese, E. J. An assessment of anxiolytic drug screening tests: hormetic dose responses predominate. *Critical reviews in toxicology* 38, (2008).
84. McCormick, C. M. & Green, M. R. From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: Investigations in rodent models. *Neuroscience* 249, 242–257 (2013).
85. Barnum, C. J., Pace, T. W. W., Hu, F., Neigh, G. N. & Tansey, M. G. Psychological stress in adolescent and adult mice increases neuroinflammation and attenuates the response to LPS challenge. *J. Neuroinflammation* 9, 9 (2012).
86. Kumar, B., Kuhad, A. & Chopra, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: Behavioral and biochemical evidences. *Psychopharmacology (Berl)*. 214, 819–828 (2011).
87. Liu, Y.-N. et al. TNF $\alpha$  mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. *Eur. Cytokine Netw.* 26, 15–25 (2016).
88. Xue, J. et al. L-Menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 134, 42–48 (2015).
89. Budiu, R. A. et al. Restrain and social isolation stressors differentially regulate adaptive immunity and tumor angiogenesis in a breast cancer mouse model. *Cancer Clin. oncol* 6, 12–24 (2017).
90. Lowrance, S. A., Ionadi, A., McKay, E., Douglas, X. & Johnson, J. D. Sympathetic nervous system contributes to enhanced corticosterone levels following chronic stress. *Psychoneuroendocrinology* 68, 163–170 (2016).
91. Couch, Y. et al. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhibits aggressive and augments depressive behaviours in a chronic mild stress model in mice. *J. Neuroinflammation* 13, 108 (2016).

92. Gu, H., Tang, C., Peng, K., Sun, H. & Yang, Y. Effects of Chronic Mild Stress on the Development of Atherosclerosis and Expression of Toll-Like Receptor 4 Signaling Pathway in Adolescent Apolipoprotein E Knockout Mice. 2009, (2009).
93. Li, C.-F. et al. ERK-dependent brain-derived neurotrophic factor regulation by hesperidin in mice exposed to chronic mild stress. *Brain Res. Bull.* 124, 40–47 (2016).
94. Li, J. et al. Nobiletin ameliorates the deficits in hippocampal BDNF, TrkB, and synapsin i induced by chronic unpredictable mild stress. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2013, (2013).
95. Goncharova, N. D. Stress responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: age-related features of the vasopressinergic regulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4, 26 (2013).
96. Merali, Z. et al. Impact of repeated stressor exposure on the release of corticotropin-releasing hormone, arginine-vasopressin and bombesin-like peptides at the anterior pituitary. *Behav. Brain Res.* 198, 105–112 (2009).
97. de Kloet, E. R., Joëls, M. & Holsboer, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–75 (2005).
98. Stewart, L. Q., Roper, J. a, Young, W. S., O’Carroll, A-M. & Lolait, S. J. Pituitary-adrenal response to acute and repeated mild restraint, forced swim and change in environment stress in arginine vasopressin receptor 1b knockout mice. *J. Neuroendocrinol.* 20, 597–605 (2008).
99. Barbosa, P. et al. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. 183, 17–25 (2007).
100. Chassin, C. et al. Hormonal control of the renal immune response and antibacterial host defense by arginine vasopressin. *J. Exp. Med.* 204, 2837–52 (2007).
101. Boyd, J. H., Holmes, C. L., Wang, Y., Roberts, H. & Walley, K. R. Vasopressin decreases sepsis-induced pulmonary inflammation through the V2R. *Resuscitation* 79, 325–31 (2008).
102. Ferrier, L. et al. Proinflammatory role of vasopressin through V1b receptors in hapten-induced experimental colitis in rodents: implication in IBD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G1298-307 (2010).