

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

Departamento de Farmacobiología

**Efectos de diferentes esquemas de administración de
morfina, fentanilo y metadona en la señalización del
receptor Toll-like 4 en células cebadas**

Tesis que presenta

M. en C. Frida Leticia Martínez Cuevas

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directoras de Tesis

Dra. Claudia González Espinosa

Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo

Ciudad de México

Julio, 2024

Este trabajo se realizó en el laboratorio 3-4 del Centro de Investigación sobre el Envejecimiento y en el laboratorio 10 del Departamento de Farmacobiología, ambos pertenecientes al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría de las Dras. Claudia González Espinosa y Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo. Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías a través de la beca de doctorado No 753297 y del proyecto Conahcyt CF-2019-51488.

No hay nada que temer en la vida, sólo hay que comprenderlo. Ahora es el momento de comprender más, para que temamos menos.

-Marie Curie

Dedicatoria

La ciencia experimental necesita conocimiento, paciencia, tiempo, resistencia a la frustración, pero sobre todo, una red de soporte atrás de ti.

A Herman Moreira

Por ser mi mayor soporte, complemento y compañero de vida.

A mis padres

Por ser mi red de amor infinita, por ayudarme, apoyarme e impulsarme en cada paso de mi vida.

A mi hermanita

Por enseñarme que la vida es tan sencilla, feliz y maravillosa.

Agradecimientos

A mis directoras de tesis: **Dra. Claudia González Espinosa y Dra. Silvia L. Cruz Martín del Campo**, por todos los conocimientos compartidos, el apoyo y la paciencia a lo largo de esta estancia académica. Por enseñarme a ser una investigadora, estaré siempre agradecida.

A mi comité sinodal: **Dra. Iris K. Madera Salcedo, Dr. Vinicio Granados Soto, Dra. Gabriela Rodríguez Manzo y Dr. Vianney Ortiz Navarrete**, por enriquecer este trabajo. Por cada pregunta realizada en los avances que me impulsó a leer cosas nuevas para poder discutir mis resultados mejor.

A **Alfredo Ibarra Sánchez**, por todo el apoyo técnico brindado. Gracias por enseñarme todas las técnicas del laboratorio, por darme consejos para que siempre salieran los experimentos. Gracias por ser un apoyo fundamental en el laboratorio.

A **Araceli Hernández**, por apoyarme con todas las técnicas que necesité y por todas las facilidades que me brindó en el laboratorio.

A **Rodolfo Pérez Lagunes**, por facilitarme todo lo que necesité en el laboratorio y cuidar a los ratones. Gracias por siempre escucharme y apoyarme en todo lo que necesité.

A todos mis compañeros que son parte o formaron parte del laboratorio 10 y 11: **César, Iker, Karen, Apolinar, Sofia, Nancy, Marian, Magnolia, Dulce, Pao, Jesús, Alicia, Diana, Eva y Julissa** su apoyo, consejos y tiempo fueron parte importante del laboratorio.

A personas maravillosas que fueron mi soporte durante el doctorado

Damaris, Valeria, Viridiana, Gaby, Palmira y Zyanya, gracias por ser una red de apoyo bonita con quienes yo pude expresarme y desahogarme. Por los consejos brindados y todo el tiempo compartido.

Deisy y Mon, por ser unas amigas maravillosas. Gracias por el tiempo interminable en el laboratorio, por ser mis cómplices en los tiempos de pandemia. Agradezco todas las palabras de aliento y los consejos en mis días nublados.

A los amigos que con el tiempo se vuelve tu familia: **Alejandro, Hernán, Dianita y Adri**. Gracias por la hermandad que formamos, por los consejos, la comida compartida, los viajes, el tiempo juntos, los días felices y por ayudarme a pasar los días más grises.

A mi familia que siempre me ha apoyado y ha estado orgullosa de mí: **Linda, Rosy, tío Noé, tío Eurípides, mi abuelita Estela y mi abuelito Epifanio**. Gracias por estar presente en cada uno de mis logros. A mi **tía Rosalba** por ser una mujer maravillosa gracias por enseñarme a ser una mujer independiente y exitosa.

A **mis papás, Leticia y Ulises, y a mi hermanita, Tonantzin**: gracias por ser mi fuente de amor y apoyo infinita. Por siempre impulsarme y apoyarme a superarme cada día más. Gracias por enseñarme a ser la persona en la que me he convertido. Los amo infinitamente.

A **Herman Moreira**: por ser mi paz, mi cómplice y mi compañero de vida. Gracias por todos los programas del laboratorio que me instalaste, Gracias por llevarme a la UNAM y esperarme horas hasta que terminaba mis experimentos. Gracias por amarme tanto, por cuidarme y por aguantar mis días grises y de frustración. Te amo.

Índice General

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas..... | VI |
| Índice de figuras..... | X |
| Índice de tablas..... | XII |
| Resumen..... | XIII |
| Abstract..... | XIV |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Características de los opioides morfina, fentanilo y metadona..... | 1 |
| 1.2 Receptores a opioides..... | 4 |
| 1.3 Agonismo sesgado..... | 7 |
| 1.4 Efectos de la activación del receptor μ -opioide sobre células del sistema inmune..... | 8 |
| 1.5 Muerte celular inducida por opioides..... | 10 |
| 1.6 Formación de trampas extracelulares de DNA..... | 12 |
| 1.7 Receptor TLR4 y su sistema de señalización..... | 15 |
| 1.8 Células cebadas..... | 17 |
| 1.9 Efecto de los opioides sobre las Células Cebadas..... | 22 |
| 2. Planteamiento del problema..... | 25 |
| 3. Hipótesis..... | 26 |
| 4. Objetivos..... | 27 |
| 5. Materiales y métodos..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1 Animales..... | 28 |
| 5.2 Fármacos y reactivos..... | 28 |
| 5.3 Cultivo de BMMCs..... | 31 |
| 5.4 Pruebas de viabilidad..... | 31 |
| 5.5 Detección de TNF- α mediante ELISA..... | 32 |
| 5.6 <i>Western blot</i> | 32 |
| 5.7 Inmunoprecipitación..... | 32 |
| 5.8 Inmunofluorescencia..... | 33 |
| 5.9 Microscopía electrónica de barrido..... | 33 |
| 5.10 Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno..... | 34 |
| 5.11 Determinación del calcio intracelular..... | 34 |
| 5.12 Prueba de plancha caliente..... | 35 |
| 5.13 Lavados peritoneales..... | 35 |
| 5.14 Reconstitución de ratones W-Sh con BMMCs..... | 35 |
| 5.15 Análisis estadístico..... | 36 |
| 6. Diseño experimental..... | 35 |
| 6.1 Estandarización del modelo <i>in vitro</i> para la exposición aguda y prolongada a morfina, fentanilo y metadona, analizando sus efectos sobre la secreción de TNF- α inducida por el LPS en BMMCs..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 6.2 Análisis de los principales puntos de la vía de señalización del TLR4 afectados por la exposición a morfina, fentanilo y metadona en BMMCs..... | 38 |
| 6.3 Determinación de la participación de la β -arrestina 2 en el efecto inhibitor de los opioides sobre la señalización del receptor TLR4 en BMMCs..... | 39 |
| 6.4 Análisis de la participación del receptor μ en el efecto inhibitor de los opioides sobre el receptor TLR4..... | 39 |
| 6.5 Evaluación de los efectos de la administración aguda y repetida de dosis analgésicas de metadona en la liberación de TNF- α por el LPS en células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones..... | 40 |
| 6.6 Estudio de la muerte celular mediada por metadona en BMMCs... | 41 |
| 7. Resultados..... | 43 |
| 7.1 Efectos de la morfina, el fentanilo y la metadona sobre la liberación de TNF- α y la viabilidad celular en BMMCs..... | 43 |
| 7.1.1 El fentanilo y la metadona inhiben la secreción de TNF- α mediada por el LPS a diferentes tiempos de exposición..... | 43 |
| 7.1.2 La exposición prolongada de fentanilo induce muerte celular de BMMCs..... | 45 |
| 7.1.3 La estimulación prolongada con los opioides inhibe la secreción de TNF- α mediada por el LPS..... | 46 |
| 7.2 Efectos de la morfina, el fentanilo y la metadona sobre moléculas involucradas en la señalización del receptor TLR4 en BMMCs..... | 48 |

| | |
|--|----|
| 7.2.1 El fentanilo y la metadona previenen la fosforilación del diferentes cinasas inducida por el LPS..... | 48 |
| 7.2.2 Los opioides promueven la formación del complejo β -arrestina 2/TRAF6..... | 50 |
| 7.2.3 El receptor μ media los efectos inhibidores de la morfina, el fentanilo y la metadona sobre el TLR4..... | 50 |
| 7.3 La metadona modula la secreción de TNF- α de células cebadas presentes en la cavidad peritoneal de ratones..... | 51 |
| 7.4 Evaluación del mecanismo de muerte celular producida por una concentración alta de metadona en BMMCs..... | 56 |
| 7.4.1 La metadona produce la muerte rápida de BMMCs de manera dependiente de la concentración..... | 56 |
| 7.4.2 La metadona induce la muerte de BMMCs a través de la formación de trampas extracelulares de ADN..... | 58 |
| 7.4.3 La producción de especies reactivas de oxígeno y el aumento de Ca^{2+} intracelular son críticos en la muerte celular inducida por metadona en BMMCs..... | 62 |
| 7.4.4 Los receptores μ -opioide y TLR4 participan en la muerte celular inducida por metadona en BMMCs..... | 64 |
| 7.4.5 El receptor μ requiere del receptor TLR4 para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno mediada por metadona | 66 |
| 7.4.6 La activación del receptor μ induce la movilización de calcio en BMMCs..... | 67 |

| | |
|--|-----------|
| 7.5 Los receptores μ y TLR4 comparten la misma localización intracelular en BMMCs..... | 67 |
| 8. Discusión..... | 69 |
| 8.1 La morfina, el fentanilo y la metadona inhiben de forma diferencial la secreción de TNF- α inducida por el LPS a través de la activación del receptor μ en células cebadas..... | 71 |
| 8.2 Modulación de la secreción de TNF- α por parte de la metadona en la cavidad peritoneal de ratones..... | 74 |
| 8.3 La metadona induce la muerte celular mediante la formación de trampas extracelulares de ADN a través de la coactivación de los receptores μ y TLR4..... | 75 |
| 9. Conclusiones..... | 81 |
| 10. Perspectivas..... | 82 |
| 11. Referencias..... | 85 |

Abreviaturas

| | |
|----------------------|--|
| β -arr2 | β -arrestina 2 |
| AC | Adenilato ciclasa |
| AMP | Adenosín monofosfato cíclico |
| AP-2 | Proteína-adaptadora 2 |
| BMDCs | Macrófagos derivados de médula ósea |
| BMMCs | Células cebadas derivadas de médula ósea |
| BSA | Albumina de suero bovino |
| C5aR | Receptor 1 del componente 5a del complemento |
| $[Ca^{2+}]_i$ | Calcio intracelular |
| CB1 | Receptor a cannabinoides 1 |
| CB2 | Receptor a cannabinoides 2 |
| CCs | Células cebadas |
| CHO | Células de ovario de hámster chino |
| COX-2 | Ciclooxigenasa 2 |
| C-terminal | Carboxilo-terminal |
| CXCR2 | Receptor de IL-8 |
| DAMPs | Patrones moleculares asociados a daño |
| DCFH ₂ DA | 2´7´diclorodihidrofluoresceína |
| ERK1/2 | Cinasa regulada por señales extracelulares |
| ESID | Detector de luz transmitida |
| ETs | Trampas extracelulares de ADN |
| ETosis | Muerte por formación de ETs |
| FBS | Suero fetal bovino |

| | |
|------------------|---|
| FcεRI | Receptor de alta afinidad para la IgE |
| FEN | Fentanilo |
| F _{max} | Máximo de fluorescencia |
| F _{min} | Mínimo de fluorescencia |
| FPR | Receptor de péptidos con metionina formilada |
| IFN-γ | Interferón γ |
| IKKα/β | Cinasa del complejo inhibidor del factor κB |
| iNOS | Óxido nítrico sintasa |
| IP ₃ | Inositol trifosfato |
| IRAK | Cinasas asociadas al receptor de interleucina 1 |
| GDP | Guanosín difosfato |
| GRK | Cinasa reguladora de la señalización de la proteína G |
| GSDMD | Gasdermina D |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| JNK | Cinasa del extremo N-terminal de c-Jun |
| LBP | proteína de unión al LPS |
| LP | Lavado peritoneal |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LTC | Linfocitos T citotóxicos |
| LTR | Linfocitos T reguladores |
| MAPKs | Cinasas activadas por mitógeno |
| MCETs | Trampas extracelulares de células cebadas |
| Mcl-1 | Proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide inducida |
| MD2 | Factor de diferenciación mieloide 2 |

| | |
|------------------|--|
| MGPRX2 | Receptor X2 relacionado con Mas acoplado a proteína G |
| MOR | Morfina |
| mPTP | Poros de transición de permeabilidad mitocondrial |
| MTD | Metadona |
| MyD88 | Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 |
| NA | No aplica |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| ND | No determinado |
| NETs | Trampas extracelulares de neutrófilos |
| NLT | Naltrindol |
| NLX | Naloxona |
| N-terminal | Amino-terminal |
| OsO ₄ | Tetróxido de osmio |
| p38 | Cinasa activada por mitógeno |
| PAD4 | Isoenzima proteína-arginina desiminasa 4 |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PFA | Paraformaldehído |
| PI3K | Fosfoinositol-3 cinasa |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PMA | Forbol-12-miristato-13acetato |
| PPAR-γ | Receptor activado por proliferador de peroxisoma γ |
| PVDF | Difluoruro de polivinilideno |
| RE | Retículo endoplásmico |
| RIPK3 | Cinasa serina/treonina 3 |

| | |
|---------------|---|
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SCF | Factor de células madre |
| SHIP1 | Fosfatasa de fosfatidilinositol |
| SI | Sistema inmune |
| SNC | Sistema nervioso central |
| Syk | Cinasa de tirosinas del bazo |
| TAK1 | Cinasa activada por el factor de crecimiento transformante beta 1 |
| TBS | Buffer de solución salina con tris |
| TE | Tolerancia a endotoxina |
| TIR | Toll-interleucina-1 |
| TIRAP | Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR |
| TLR4 | Receptor <i>Toll-like 4</i> |
| TM | Transmembranal |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral α |
| TRAF6 | Factor 6 asociado a TNF |
| TRAM | Adaptador relacionado con TRIF |
| UA | Unidades arbitrarias |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| VH | Vehículo |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Fig. 1 Estructura de la morfina..... | 2 |
| Fig. 2 Estructura del fentanilo..... | 2 |
| Fig. 3 Estructura de la metadona..... | 3 |
| Fig. 4 Estructura general de los receptores opioides..... | 5 |
| Fig. 5 Señalización de los receptores opioides..... | 7 |
| Fig. 6 Mecanismos involucrados en la formación de las trampas de ADN.... | 14 |
| Fig. 7 Señalización del receptor TLR4..... | 16 |
| Fig. 8 Célula cebada de tejido mucosal y tejido conectivo..... | 19 |
| Fig. 9 Secreción de moléculas de las células cebadas por diferentes estímulos..... | 20 |
| Fig. 10 La morfina inhibe la señalización del receptor TLR4..... | 23 |
| Fig. 11 Evaluación de la secreción de TNF- α por exposiciones agudas con los opioides..... | 37 |
| Fig. 12 Estandarización de las estimulaciones prolongadas con los opioides..... | 38 |
| Fig. 13 Evaluación de la fosforilación de cinasas por los opioides..... | 39 |
| Fig. 14 Esquema del tratamiento agudo de metadona en ratones..... | 40 |
| Fig. 15 Esquema de administraciones repetidas de metadona..... | 41 |
| Fig. 16 El fentanilo y la metadona inhiben la secreción de TNF- α mediada por el LPS..... | 43 |
| Fig. 17 La metadona 1 mM disminuye la viabilidad celular..... | 44 |
| Fig. 18 La metadona inhibe la secreción de TNF- α mediada por el LPS a tiempos largos de incubación..... | 45 |
| Fig. 19 El fentanilo induce la muerte celular a tiempos prolongados de exposición..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Fig. 20 El tratamiento prolongado con los opioides inhibe la señalización del receptor TLR4 en BMMCs..... | 47 |
| Fig. 21 El fentanilo y la metadona impiden la fosforilación mediada por el LPS de diferentes cinasas..... | 49 |
| Fig. 22 Los opioides aumentan la formación del complejo β -arrestina 2/TRAF6..... | 50 |
| Fig. 23 El efecto inhibitor de los opioides sobre el receptor TLR4 está mediado por el receptor μ | 51 |
| Fig. 24 La dosis analgésica de 10 mg/kg de metadona inhibe la secreción de TNF- α en la cavidad peritoneal de ratones..... | 53 |
| Fig. 25 Las administraciones repetidas de metadona modifican la secreción de TNF- α en la cavidad peritoneal de ratones..... | 54 |
| Fig. 26 El efecto inhibitor de la metadona sobre la secreción de TNF- α inducida por el LPS está mediado por las células cebadas presentes en la cavidad peritoneal de ratones células cebadas..... | 55 |
| Fig. 27 Curso temporal de la inducción de muerte celular con PMA..... | 57 |
| Fig. 28 Curva concentración respuesta de la muerte celular inducida por la metadona..... | 57 |
| Fig. 29 Curso temporal del efecto de muerte celular inducida por la metadona en BMMCs..... | 58 |
| Fig. 30 La metadona induce la formación de trampas de ADN en BMMCs: microscopía confocal..... | 59 |
| Fig. 31 La metadona induce la formación de trampas de ADN en BMMCs: microscopía de barrido..... | 60 |
| Fig. 32 Las trampas de ADN inducidas por la metadona contienen a la histona 3 citrulinada y a la triptasa..... | 61 |
| Fig. 33 La metadona induce la producción de especies reactivas de oxígeno en BMMCs..... | 62 |
| Fig. 34 La metadona aumenta la concentración de calcio intracelular en BMMCs..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Fig. 35 La muerte celular inducida por la metadona depende de la producción de especies reactivas de oxígeno y el aumento de calcio intracelular..... | 63 |
| Fig. 36 La muerte celular inducida por la metadona en BMMCs depende de los receptores μ y TLR4 | 65 |
| Fig. 37 La producción de especies reactivas de oxígeno inducida por la metadona es dependiente de los receptores μ y TLR4..... | 66 |
| Fig. 38 El incremento de calcio intracelular producido por la metadona depende del receptor μ | 67 |
| Fig. 39 Los receptores μ y TLR4 ocupan el mismo espacio intracelular..... | 68 |
| Fig. 40 La morfina, el fentanilo y la metadona inhiben la señalización del receptor TLR4 activado por el LPS..... | 72 |
| Fig. 41 La metadona induce la formación de trampas extracelulares en células cebadas mediante la activación de los receptores μ y TLR4..... | 76 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Propiedades farmacológicas de la morfina, el fentanilo y la metadona..... | 4 |
| Tabla 2. Tipos de muerte celular inducida por los opioides..... | 12 |
| Tabla 3. Procesos de secreción de moléculas en las células cebadas..... | 21 |
| Tabla 4. Efectos de la morfina, el fentanilo y la metadona en BMMCs..... | 24 |
| Tabla 5. Anticuerpos utilizados en este trabajo..... | 30 |
| Tabla 6. Efectos de los diferentes tratamientos con morfina, fentanilo y metadona sobre las células cebadas..... | 70 |

Resumen

Los opioides se usan clínicamente para tratar el dolor postoperatorio y el dolor oncológico. Su uso no médico se debe a sus efectos psicoactivos. El mecanismo de acción de los opioides sobre el sistema nervioso se conoce con detalle, pero no sus efectos sobre el sistema inmune (SI). La morfina, el fentanilo y la metadona son agonistas del receptor μ que también actúan sobre las células cebadas y el receptor de la inmunidad innata TLR4. Las células cebadas tienen un papel fundamental en las alergias y el desarrollo del cáncer ya que impiden la diseminación de patógenos en el huésped, monitorean la homeostasis corporal y contribuyen al desarrollo de la inmunidad adaptativa. Hay evidencia de que la morfina inhibe las acciones del TLR4 en las células cebadas porque disminuye la secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) mediada por el lipopolisacárido (LPS) bacteriano a través de la activación de receptores μ y δ , pero se desconocen los efectos de otros fármacos. El presente trabajo estudia el efecto de la administración aguda y repetida del fentanilo y la metadona en las células cebadas derivadas de médula ósea de ratón (BMMCs, por sus siglas en inglés). Los resultados indican que: 1) la metadona (1 mM), de forma aguda, induce la muerte celular; 2) una sola administración de morfina, fentanilo o metadona inhibe la señalización del receptor TLR4 activado por el LPS, con diferencias en concentraciones y tiempo de exposición; 3) la activación del receptor μ -opioides por los tres fármacos inhibe la fosforilación de IKK α/β e induce la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6; 4) la exposición prolongada (12 h) a una concentración alta de fentanilo (1 mM) induce la muerte celular; 5) la muerte celular mediada por la metadona ocurre por la formación de trampas extracelulares en células cebadas (MCETosis), depende de los receptores μ -opioides y TLR4, de la producción de especies reactivas de oxígeno y del aumento del calcio intracelular. En conclusión, la morfina y la metadona produjeron una inhibición similar de la señalización del receptor TLR4, a diferentes concentraciones y tiempos de estimulación. La metadona, a las dosis más altas, indujo muerte celular por MCETosis a través de la activación de los receptores tanto μ como TLR4.

Abstract

Opioids are used clinically to treat postoperative and cancer pain. Their non-medical use is due to their psychoactive effects. The mechanism of action of opioids on the nervous system is known in detail, but their effects on the immune system (IS) are not. Morphine, fentanyl, and methadone are μ -opioid receptor agonists that also act on mast cells (MCs) and the innate immune receptor TLR4. MCs play a fundamental role in allergies and cancer development since they prevent the spread of pathogens in the host, monitor body homeostasis, and contribute to the development of adaptive immunity. There is evidence that morphine inhibits the actions of TLR4 in MCs because it decreases the secretion of tumor necrosis factor α (TNF- α) mediated by bacterial lipopolysaccharide (LPS) through the activation of μ - and δ -opioid receptors, but little is known about the effects of other drugs. The present work studies the effects of acute and repeated administrations of fentanyl and methadone on bone marrow-derived mast cells (BMMCs). The results show that: 1) Methadone (1 mM) acutely induces cell death; 2) A single administration of morphine, fentanyl, or methadone can inhibit LPS-activated TLR4 receptor signaling. However, the extent of this inhibition varies, depending on the drug's concentration and exposure time. This finding underscores the role of opioids in modulating the immune system's response, a crucial aspect of their pharmacological action; 3) The three drugs activate the μ -opioid receptor by inhibiting the phosphorylation of IKK α / β and induce the formation of the β -arr2/TRAF6 complex; 4) Prolonged exposure (12 h) to a high fentanyl concentration (1 mM) induces cell death; and 5) Methadone-mediated cell death occurs through the formation of extracellular traps in MCs (MCETosis), which depends on μ -opioid and TLR4 receptor activation, the production of reactive oxygen species (ROS), and the increase in intracellular calcium. In conclusion, morphine and methadone produced similar inhibition of TLR4 receptor signaling at different concentrations and stimulation times. Methadone, at higher doses, induced cell death due to MCETosis through the activation of both μ -opioid and TLR4 receptors.

1. Introducción

Los opioides tienen actividad analgésica, por lo que se usan en la clínica para tratar el dolor intenso y postoperatorio. Sin embargo, su consumo crónico puede producir tolerancia y adicción. El consumo no médico de fentanilo ha contribuido de manera significativa a la muerte por sobredosis de opioides en adultos jóvenes en Estados Unidos (Romero *et al.*, 2016; Torralva y Janowsky 2019). Las adaptaciones moleculares que se producen por el consumo repetido de opioides se manifiestan por la presentación de un síndrome de abstinencia con malestar clínico significativo, lo que dificulta que las personas dejen de consumirlos. Debido a esto, la metadona, un opioide eficaz por vía oral, con cinética de eliminación más lenta que la de la morfina y el fentanilo, se ha aprobado como una alternativa de terapia asistida por medicamentos para personas con trastornos de uso de opioides (Tegeder y Geisslinger 2004; Degenhardt *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2016).

Los opioides actúan en múltiples sistemas del organismo, entre ellos el sistema inmune (SI). En este proyecto se hace un análisis comparativo de los efectos de la morfina, el fentanilo y la metadona sobre un tipo particular de células del sistema inmune: las células cebadas.

1.1 Características de la morfina, el fentanilo y la metadona.

La morfina es un alcaloide natural derivado de la planta de la amapola *Papaver somniferum*. Es agonista de los tres subtipos de receptores opioides, el μ , el δ y el κ , con mayor afinidad por el receptor (Zhuang *et al.*, 2022). La dosis analgésica de la morfina en humanos es de 10 mg/ml y tiene una vida media de eliminación de entre 3 y 4 horas (Cruz y Granados-Soto, 2015).

La morfina presenta una estructura química (Fig. 1) compuesta por un esqueleto de fenantreno, un furano, una piperidina con un grupo N-metilo y dos grupos hidroxilos (diol), cuyo nombre IUPAC es: (5 α ,5 α)-7,8-didehidro-4,5-epoxi-17-metilmorfinan-3,6 diol. Es una base débil con un pKa de 8.2, con peso molecular de 285.3 g/mol y es muy poco soluble en lípidos (Concheiro *et al.*, 2018; Cruz y Granados-Soto, 2015).

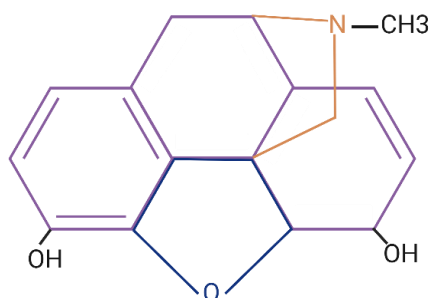


Figura 1. Estructura de la morfina. El esqueleto de fenantreno se muestra en morado, el grupo furano en azul y la piperidina en anaranjado.

El fentanilo es un agonista sintético específico del receptor μ -opioide, 100 veces más potente que la morfina, pero con un efecto de corta duración. Por su rápido inicio de acción, se utiliza como analgésico y anestésico en cirugías (Cruz y Granados-Soto, 2015; Zhuang et al., 2022). Su estructura (Fig. 2) está compuesta por un grupo fenetilo, una piperidina, un grupo propionilo y un benceno unidos a la piperidina por un nitrógeno. La estructura anterior da el nombre IUPAC de N-1-(2-feniletil)-4-piperidinil)-N-fenil-propanamida (Concheiro et al., 2018). Tiene un pKa de 8.8, un peso molecular de 336.5 g/mol y es muy soluble en lípidos.

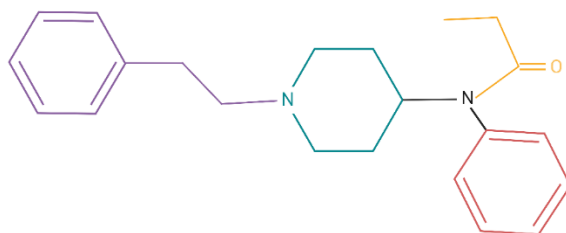


Figura 2. Estructura del fentanilo. El fentanilo está formado por un grupo fenetilo (morado), una piperidina (verde), un grupo propionilo (amarillo) y un benceno (rojo) unidos a la piperidina por un nitrógeno.

La metadona también es un agonista específico del receptor μ (Cruz y Granados-Soto, 2015). Tiene un tiempo de acción más prolongado que el de la morfina debido a que presenta una cinética de eliminación más lenta, con una vida media promedio de aproximadamente 24 h. Por esta razón, la metadona ayuda a prevenir el síndrome de abstinencia generado por los opioides, empleándose como terapia de

reemplazo en usuarios dependientes (Martin 1984; Rang *et al.*, 2008; Vallejo *et al.*, 2011; Brunton *et al.*, 2012).

La metadona está formada por dos grupos fenilos unidos a un heptano y una dimetilamina. Su nombre IUPAC es 6-(dimetilamino)-4,4-difenilheptan-3-ona. Tiene un peso molecular de 309.4 g/mol y un pKa de 9.1 y es el agonista μ más liposoluble de los tres que se manejaron en este proyecto (Concheiro *et al.*, 2018; McQuay *et al.*, 1989).

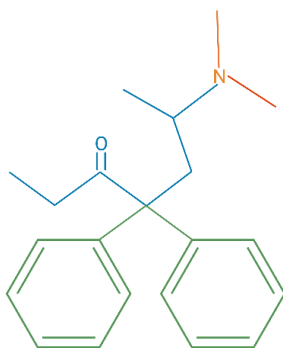


Figura 3. Estructura de la metadona. La metadona está compuesta por dos fenilos (verde), un heptano (azul) y un grupo dimetilamina (naranja).

Algunas de las características más importantes de estos fármacos se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades farmacológicas de la morfina, el fentanilo y la metadona.

| Características | Morfina | Fentanilo | Metadona |
|--|-----------------------------|--------------------------|--|
| Dosis equianalgésica única (mg/ml) | 10 | 0.1 | 10 |
| Vida media de eliminación (horas) | 3-4 | 1-2 | 24 |
| Selectividad | μ , δ y κ | μ | μ |
| Ki por el receptor μ -opioide (nM) | 14 | 0.4 | 0.72 |
| Señalización preferencial | G _{i/o} | β -arrestina2 | G _{i/o} |
| Usos | Analgésico | Analgésico Anestésico | Analgésico Terapia de asistida por medicamentos |

1.2 Receptores opioides

Los 3 tipos principales receptores opioides (μ , κ y δ) se expresan en diferentes tipos de células, entre ellas las del sistema inmune (González-Espinosa et al., 2022). Estos receptores tienen siete dominios transmembranales (Fig. 4), un dominio amino-terminal (N-terminal) con sitios de glicosilación y un dominio carboxilo-terminal (C-terminal) con sitios de fosforilación, palmitoilación y ubiquitinación (Carranza-Aguilar, et al., 2022; Cruz y Granados-Soto, 2015).

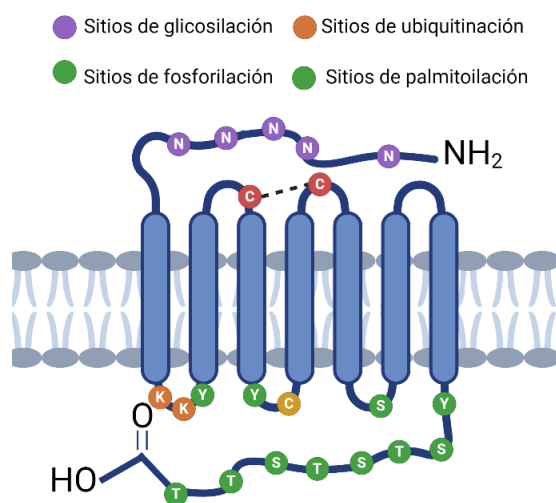


Figura 4. Estructura general de los receptores opioides. Los receptores opioides tienen siete dominios TM, un dominio N-terminal con sitios de glicosilación y un C-terminal con sitios de ubiquitinación, fosforilación y palmitoilación. N= asparagina, C= cisteína, K= lisina, Y= tirosina, S= serina y T= treonina.

El receptor μ se encuentra acoplado a una proteína G heterotrimérica inhibidora ($G_{i/o}$) formada por una subunidad α_i y un complejo $\beta\gamma$. Tras la unión del agonista al receptor, éste sufre un cambio conformacional que permite que la proteína G_i intercambie guanósín difosfato (GDP) por guanósín trifosfato (GTP) y se disocien sus subunidades. La subunidad α_i inhibe a la enzima adenilato ciclasa (AC) y disminuye la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Por otro lado, el complejo $\beta\gamma$ aumenta la conductancia de los canales de K^+ , disminuye la de los canales de Ca^{2+} y activa la cascada de cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Faouzi et al., 2020; Stenkamp et al., 2002; Tegeder y Geisslinger, 2004). Las MAPKs comprenden a la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), la cinasa del extremo N-terminal de c-Jun (JNK) y la cinasa p38, que contribuyen a la activación de factores de transcripción, entre los que destacan AP-1 y NF- κ B. La subunidad $\beta\gamma$ también puede activar a la fosfolipasa C (PLC) e incrementar la concentración del inositol trifosfato (IP_3), regulando la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 5).

La señalización de los receptores opioides continúa aún después del desacople de la proteína G_i . Cuando el receptor se encuentra libre de la proteína G_i y unido al

ligando, quedan expuestos los sitios intracelulares de fosforilación localizados en la tercera asa citosólica y en el extremo carboxilo terminal (Tian et al., 2014; Williams et al., 2013; Zuo, 2005). Las cinasas reguladoras de la señalización de proteínas G (GRK) se encargan de fosforilar los residuos de serina y treonina intracelulares del receptor μ , lo que facilita el acople de la β -arrestina 2 (β -arr2). Los patrones o códigos de fosforilación intracelulares del receptor estabilizan la unión con la β -arrestina2 y dan paso al reclutamiento de proteínas involucradas en la internalización del receptor μ -opioide, como la proteína-adaptadora 2 (AP-2), la clatrina y la dinamina (Fessart y Delom, 2011; Gondin et al., 2019).

En el proceso de internalización, la β -arrestina2 sirve como un andamio que estabiliza a la AP-2 y a la clatrina formando en la membrana celular una vesícula alrededor del receptor μ . La dinamina corta la membrana celular liberando a las vesículas recubiertas de clatrin. Cuando las vesículas que contienen al receptor μ están internalizadas, la cubierta de clatrin se desensambla, dejando al receptor μ unido a la β -arrestina2 (Fessart y Delom, 2011; Lemel et al., 2020; Watari et al., 2014). Una vez internalizado, el receptor μ -opioide unido a la β -arr2 puede seguir señalizando a través de las MAPKs (Che et al., 2021).

El receptor μ y la β -arrestina2 pueden internalizarse o no, dependiendo del complejo ligando-receptor particular. También se ha visto que los ligandos opioides tienen una señalización preferencial por la vía de las proteínas G o la vía de la β -arrestina2, a lo que se le conoce como agonismo sesgado (Faouzi et al., 2020; Williams et al., 2013).

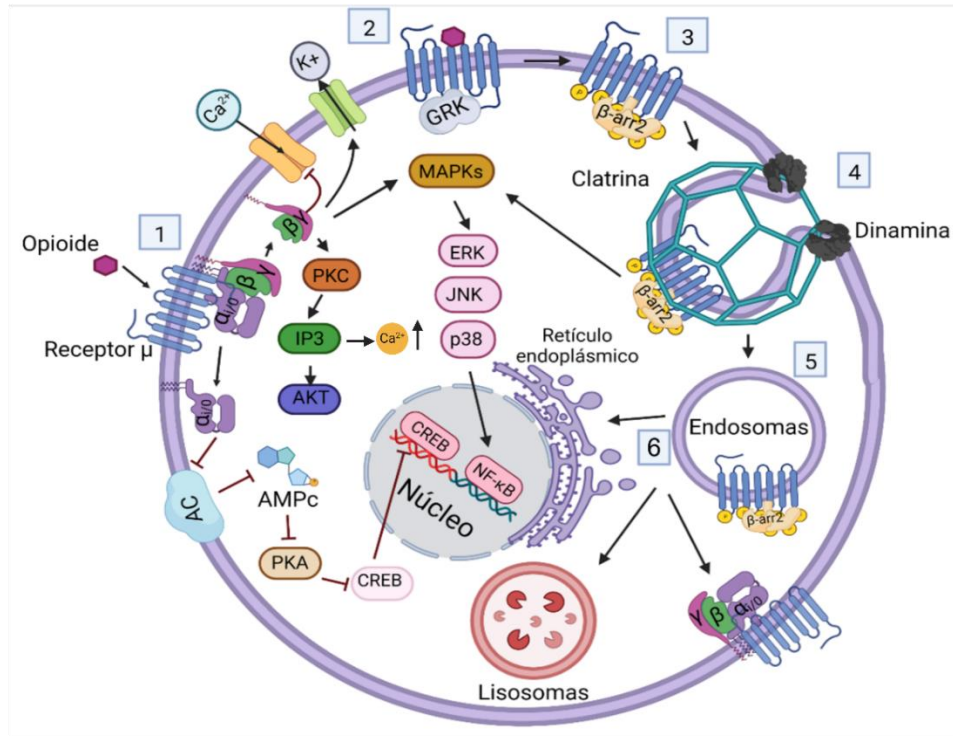


Figura 5. Señalización de los receptores opioides. 1) El ligando se une al receptor, lo cual genera un cambio conformacional que conduce al desacople de las subunidades $\alpha_{i/o}$ y $\beta\gamma$. Por un lado, la subunidad $\alpha_{i/o}$ inhibe al adenilato ciclasa (AC). Por otro lado, las subunidades $\beta\gamma$ inhiben a los canales de Ca^{2+} , aumentan la conductancia de los canales de K^+ y activan a diferentes MAP cinasas. 2) Cuando el receptor se encuentra libre de la proteína G, la cinasa reguladora de la señalización de la proteína G (GRK) fosforila al receptor para 3) promover la unión de la proteína β -arrestina 2 (β -arr2) y con ello comenzar el proceso de internalización del receptor. 4) El proceso de internalización se lleva a cabo con la ayuda de la dinamina y la clatrina. 5) Una vez internalizado, el receptor se puede dirigir (6) a la nube perinuclear en el retículo endoplásmico, a los lisosomas para su degradación o retornar a la membrana plasmática y reinsertarse en ella.

1.3 Agonismo sesgado

Los ligandos opioides pueden presentar una señalización preferencial por la vía de la proteína $G_{i/o}$ o por la vía de la β -arrestina2 (Che et al., 2021). La morfina y la metadona unidas al receptor μ tienen una señalización preferencial por la vía de la proteína G_i ; mientras que el fentanilo, acoplado al receptor μ , señala preferentemente por la vía de la β -arrestina2 (Faouzi et al., 2020; Williams et al., 2013), por lo que se dice que la morfina y la metadona son ligandos sesgados hacia la vía de la proteína G mientras que el fentanilo lo es por la vía de la β -arrestina2.

El agonismo sesgado se ha asociado a los patrones de fosforilación del receptor μ -opioide. Por ejemplo, se sabe que el cambio conformacional del receptor generado por la morfina induce la fosforilación de los residuos intracelulares Ser363, Thr370, Ser375 y Thr376 en una línea celular derivada de riñón embrionario humano (células HEK293) (Doll et al., 2011). Por su lado, el fentanilo favorece la fosforilación de los residuos Thr180, Ser363, Thr370, Ser375, Thr376 y Thr379 del receptor μ , en células HEK293 y en neuronas del *locus coeruleus* de ratones (Kliwer et al., 2019; Williams et al., 2013). Respecto a la metadona no se conocen los aminoácidos específicos del receptor μ que se fosforilan, pero se sabe (en células de ovario de hámster chino, CHO) que induce una mayor cantidad de residuos fosforilados que la morfina (Yu et al., 1997). Los estudios sobre el agonismo sesgado de los opioides no han incluido hasta el momento a células del sistema inmune.

1.4 Efectos de la activación del receptor μ -opioide sobre el sistema inmune

Se sabe que las personas que consumen opioides presentan mayor incidencia de enfermedades infecciosas respiratorias, de la piel, de tejidos blandos, de huesos y de articulaciones que quienes no los consumen (Quang-Cantagrel et al., 2001; R. Zhang et al., 2018). Los pacientes bajo terapia asistida por metadona presentan menor activación de linfocitos T citotóxicos y linfocitos T reguladores, por lo que tienen una respuesta inmune adaptativa deficiente (Mazahery et al., 2020; Quang-Cantagrel et al., 2001). Algunos también presentan una inflamación sistémica debido a un aumento en la concentración de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (Chan et al., 2015). Esto sugiere que los consumidores de opioides no solo se encuentran inmunosuprimidos (sistema inmune incapaz de responder adecuadamente), sino que también pasan por etapas de inflamación crónica. Debido a lo anterior, es importante investigar cuáles son los efectos de los opioides sobre células específicas del sistema inmune.

Las investigaciones de opioides en animales han reportado que la administración crónica de morfina en ratones retarda la cicatrización de heridas, debido a la inhibición de la secreción de quimiocinas para atraer a macrófagos y neutrófilos al

sitio de daño (Rojavin et al., 1993) También, la activación del receptor μ , por la morfina y la metadona, disminuye la producción de óxido nítrico, óxido nítrico sintasa (iNOS) y prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (COX-2) en macrófagos expuestos al LPS (Tubaro et al., 1985). En cultivos celulares de macrófagos y células *Natural killer* una sola administración de morfina, fentanilo o metadona disminuye su actividad fagocítica y la citotoxicidad (Börner et al., 2008, 2013; Franchi et al., 2007; Rojavin et al., 1993). En linfocitos T, la morfina suprime su proliferación y la producción de interferón γ (IFN- γ) (Bidlack et al., 2006; Gonzalez-Espinosa et al., 2022).

Cuando hay una estimulación prolongada del receptor μ se genera tolerancia o hipersensibilidad sobre la secreción de citocinas. La estimulación del receptor μ -opioide durante 24 h no produce secreción alguna de citocinas, pero cuando es por 48 h induce la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), IL-10 y RANTES, en células mononucleares de sangre periférica humana, (Wetzel et al., 2000). En células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones, la administración repetida de fentanilo incrementa la concentración de TNF- α generada por el LPS (Molina-Martínez et al., 2014). Lo anterior podría llevar a pensar que la estimulación prolongada del receptor μ en células del sistema inmune cambia la señalización intracelular del receptor en comparación con la estimulación aguda.

Los ligandos opioides también activan al receptor de reconocimiento de patrones de la inmunidad innata Toll-like 4 (TLR4) (ver sección 1.6) y al receptor X2 acoplado a proteína G relacionado con Mas (en humanos MGPRX2, en ratones Mrgprb2). El receptor MGPRX2 es un receptor acoplado a proteínas G acoplado a $G_{i/o}$ o G_q (Bader et al., 2014). A través de este último, los opioides generan reacciones pseudo-alérgicas (Lansu et al., 2017; McNeil et al., 2015) e incluso pueden desencadenar el desarrollo de granulomas en ratones (Zhang et al., 2019). En nuestros laboratorios se ha demostrado que la morfina y el fentanilo administrados de manera aguda inhiben la secreción del TNF- α causada por el reto con LPS en células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones (Madera-Salcedo et al., 2011; Molina-Martínez et al., 2014). Estudios *in vitro* demuestran que el efecto inhibitor

de la morfina está asociado a la formación de un complejo entre la β -arrestina2 y TRAF-6, un adaptador clave en la señalización del receptor TLR4 (Madera-Salcedo et al., 2013). También, existe evidencia de que la activación del receptor μ es capaz de inducir muerte celular en diferentes tipos de células del sistema inmune, incluso en células cancerosas.

1.5 Muerte celular inducida por opioides

Los opioides inducen diferentes tipos de muerte celular (Tabla 2) como piroptosis, necrosis, apoptosis y muerte por desregulación energética (Tegeeder y Geisslinger, 2004) (Tabla 2). Por ejemplo, la administración repetida de morfina y fentanilo en rata induce piroptosis (Carranza-Aguilar et al., 2020), mientras que las de metadona producen apoptosis y necrosis (Zamani et al., 2023). Estas diferencias están asociadas con la cascada de señalización que activa cada ligando opioide. Por parte de la morfina y el fentanilo hay una activación del inflammasoma formado por la proteína receptora tipo NOD 3 (NLRP3), de la caspasa 1 y de la gasdermina D (GSDMD), y por parte de la metadona, hay activación de la caspasa 3 y la cinasa de serina/treonina 3 (RIPK3) así como un aumento en la expresión de las proteínas Bcl-2, Bad y Bax, las cuales son relevantes para la vía intrínseca de la apoptosis celular (Tramullas et al., 2007; Zamani et al., 2023). Esto demuestra que pese a que los tres fármacos son agonistas del receptor μ pueden inducir una señalización intracelular diferente.

La morfina induce apoptosis, en células endoteliales humanas, por aumento de especies reactivas de oxígeno, alteraciones en la membrana mitocondrial y por activación de las caspasas 3 y 7 (Hsiao et al., 2009). La morfina, a través del receptor μ -opioide, induce el aumento de Fe^{2+} en el citosol y las mitocondrias, en células de neuroblastoma, aumentando las especies reactivas de oxígeno, lo que produce una despolarización de la membrana de las mitocondrias y promueve la muerte celular (Halcrow et al., 2022).

La metadona induce diferentes tipos de muerte celular, principalmente en células cancerosas, por lo cual se ha propuesto como un tratamiento para combatir el

cáncer. Por ejemplo, la metadona disminuye el crecimiento en células de leucemia linfoblástica aguda mediante la disminución de la expresión de la proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide inducida (Mcl-1) y aumenta la muerte celular por fragmentación de la membrana mitocondrial (Singh et al., 2011). La metadona induce necrosis mediante la desregulación del Ca^{2+} intracelular y de la cadena respiratoria, en células de neuroblastoma, pero este efecto no está mediado por el receptor μ (Pérez-Alvaréz et al., 2010, 2011). Incluso en células leucémicas quimiorresistentes, la metadona es capaz de producir apoptosis (Friesen et al., 2008, 2011, 2013). Estas investigaciones indican que es pertinente profundizar en el tipo de daño que pueden producir los opioides y los mecanismos y receptores involucrados.

Un tipo de muerte celular característico de algunas células del sistema inmune innato es la muerte celular por formación de trampas extracelulares de ADN (ETosis), que fue descrito por primera vez en neutrófilos. Este tipo de muerte celular puede producirse por exposición a diferentes estructuras patógenas, sin embargo, son pocos los reportes donde muerte por formación de trampas extracelulares de ADN se relaciona con la exposición a compuestos químicos o fármacos.

Tabla 2: Tipos de muerte celular inducida por opioides.

| Opioide | Aproximación experimental (<i>in vitro</i> o <i>in vivo</i>) | Célula | Marcadores de muerte activados | Tipo de muerte | Receptor involucrado | Referencia |
|------------------|--|---|--|----------------|---|---------------------------------|
| Morfina | Tratamiento crónico en rata <i>In vivo</i> | Neuronas y astrocitos | NLRP3 Caspasa 1 GSDMD | Piroptosis | Receptor μ (neuronas) y TLR4 (Astrocitos) | (Carranza-Aguilar et al., 2020) |
| | Estimulación única en BMDM <i>In vitro</i> | Macrófagos | Caspasa 3, 8 y 9 | Apoptosis | TLR4 y PPAR- γ | (Lin et al., 2021) |
| | Estimulación durante 48 h <i>In vitro</i> | Células endoteliales humanas | Producción de ROS, caspasa 2 y 7 y Bax | Apoptosis | Receptor μ | (Hsiao et al., 2009) |
| | Estimulación aguda <i>In vitro</i> | Células de neuroblastoma | ROS, mPTP, y aumento de Fe ²⁺ | Ferroptosis | Receptor μ | (Halcrow et al., 2022) |
| Fentanilo | Tratamiento crónico en rata <i>In vivo</i> | Neuronas y astrocitos | NLRP3 Caspasa 1 GSDMD | Piroptosis | Receptor μ (neuronas) y TLR4 (Astrocitos) | (Carranza-Aguilar et al., 2020) |
| Metadona | Administraciones repetidas (5) en rata <i>In vivo</i> | Astrocitos y microglía | Caspasa 3 RIPK3 | Necrosis | - | (Zamani et al., 2023) |
| | Tratamiento crónico en ratones <i>In vivo</i> | - | Fas y Bax | Apoptosis | - | (Tramullas et al., 2007) |
| | Estimulación por 24 h <i>In vitro</i> | Células de leucemia linfoblástica aguda | Inhibición de Mcl-1 y alteración en la membrana mitocondrial | Apoptosis | - | (Singh et al., 2011) |

BMDM: macrófagos derivados de médula ósea. NLRP3: Proteína receptora tipo NOD 3. GSDMD: gasdermina D. ROS: especies reactivas de oxígeno. mPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial. RIPK3: cinasa 3 que interactúa con el receptor a serina/treonina. Fas: proteína con dominio citoplasmático de muerte celular conservado. Bax: proteína X asociada a Bcl-2. Mcl.1: Secuencia 1 de leucemia de células mieloides.

1.6 Formación de trampas extracelulares de DNA.

Las trampas extracelulares de ADN fueron descritas por primera vez en neutrófilos en el 2004. Su formación se observó 10 min después del reto con una bacteria Gram-positiva, *S. aureus* y una Gram-negativa, *S. typhimurium* (Brinkmann et al., 2004). Sin embargo, la formación de trampas extracelulares de ADN no es exclusiva de los neutrófilos, ya que se ha observado en macrófagos, eosinófilos, microglía y CCs (Agrawal et al., 2021; Goldmann y Medina, 2012; Pertiwi et al., 2019). Los mecanismos moleculares y los receptores que desencadenan las trampas extracelulares de ADN no se encuentran del todo esclarecidos.

Las trampas extracelulares de ADN se producen cuando la célula expulsa el ADN nuclear y mitocondrial formando redes. Un mecanismo involucrado en este proceso es la producción de especies reactivas de oxígeno y el aumento de calcio

intracelular (Campillo-Navarro et al., 2018; Fonseca et al., 2018; Goldmann y Medina, 2012). La producción de especies reactivas de oxígeno puede provenir de la activación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, de la mitocondria o de los gránulos de las células del sistema inmune (Goldmann & Medina, 2012; King et al., 2015; Stoiber et al., 2015a). El aumento de calcio intracelular proviene del retículo endoplásmico (RE) o el espacio extracelular. Las especies reactivas de oxígeno y el calcio activan a la isoenzima arginina deiminasa proteína-tipo 4 (PAD4). La PAD4 induce la citrulinación de histonas y la descondensación del ADN, lo que resulta en la disrupción de la membrana nuclear (Leshner et al., 2012; Saha et al., 2019). Cuando el ADN sale al citosol se decora con “moléculas accesorias” que se encuentran en él y en los gránulos o vesículas de la célula, así como de las histonas citrulinadas. Entre estas histonas se encuentra la histona 3 (CitH3) (Al-Khafaji et al., 2016; Goldmann & Medina, 2012). Las trampas extracelulares de ADN salen de la célula por dos procesos: 1) el colapso de la membrana celular o, 2) la formación de poros de gasdermina D (Goldmann y Medina, 2012; Stoiber et al., 2015). Los receptores que se han relacionada con la formación de trampas extracelulares de ADN son: el TLR4, los receptores Fc a anticuerpos, el receptor 1 del componente 5a del complemento (C5aR), los receptores de péptidos de formilo (FPR) y el receptor de IL-8 (CXCR2), entre otros (Goldmann y Medina, 2012).

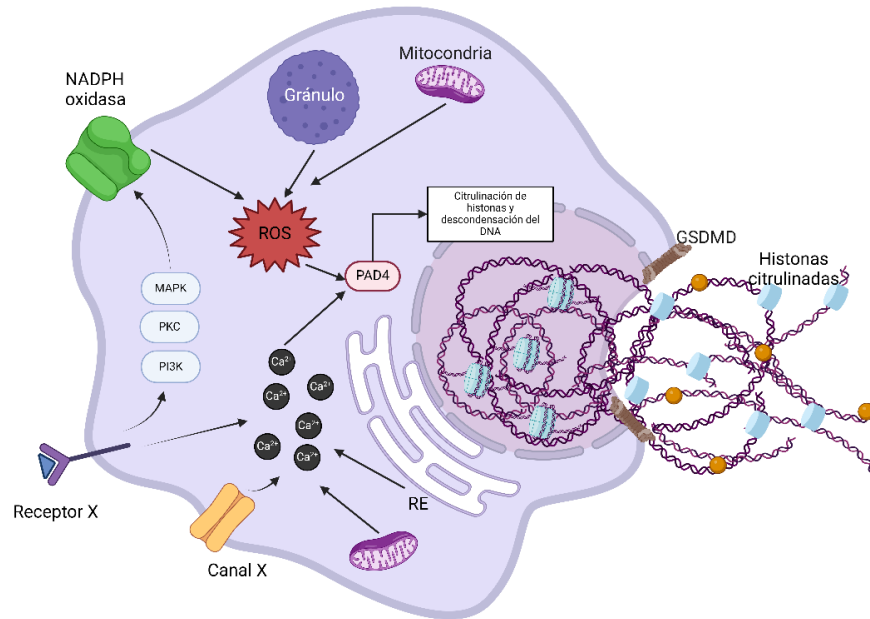


Figura 6. Mecanismos involucrados en la formación de trampas extracelulares de ADN. Receptores como el TLR4, el Fc, el C5aR, entre otros inducen el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y calcio intracelular. La producción de especies reactivas de oxígeno está regulada por la activación de MAPKs, de la PKC, del IP3K, de gránulos con contenido electrodenso y de la mitocondria. Por otro lado, el aumento de calcio está regulado por la apertura de canales, por la mitocondria y por el retículo endoplásmico (RE). Ambos procesos culminan en la activación de la isoenzima arginina deiminasa proteína-tipo 4 (PAD4), desencadenando la citrulinación de histonas y la descondensación del ADN. La descondensación del ADN induce la ruptura de la membrana nuclear, en ese momento proteínas del citosol o de los gránulos se pegan al ADN. Finalmente, el contenido sale por la disrupción de la membrana celular o por la formación de poros de gasdermina D (GSDMD) en la membrana.

La formación de trampas extracelulares de ADN en células cebadas (MCETs) se puede desencadenar por compuestos activadores de la proteína cinasa C (PKC), como el forbol-12-miristato-13acetato (PMA), citocinas como la IL-1 β , IL-23 y enzimas como la glucosa oxidasa (Möllerherm et al., 2016; Von Köckritz-Blickwede et al., 2008). Las trampas extracelulares de ADN en células cebadas están acompañadas de histonas citrulinadas, ATP, algunas citocinas, β -hexosaminidasa y triptasa (Möllerherm et al., 2016).

La formación de trampas extracelulares de ADN es un proceso que ayuda al huésped a contener la propagación de bacterias, hongos y parásitos. Sin embargo, si no se regula de forma adecuada puede inducir un proceso inflamatorio (Hidalgo et al., 2022).

1.7 Receptor TLR4 y su sistema de señalización

Todas las células del sistema inmune innato expresan al receptor TLR4. Este receptor forma parte de los receptores tipo Toll que constituyen una familia muy amplia de receptores del sistema inmune innato que ayudan a la activación y funcionamiento del sistema inmune adaptativo (Duan et al., 2022).

La estructura del receptor TLR4 contiene tres dominios: un dominio extracelular, un dominio helicoidal transmembranal y un dominio intracelular del receptor Toll-interleucina-1 (TIR). El dominio extracelular tiene tres subdominios (N-terminal, central y C-terminal) y es donde se forma el complejo con el factor de diferenciación mieloide 2 (MD2) y el LPS (Ain et al., 2020). El LPS circulante en la sangre se une a la proteína de unión al LPS (LBP). La LBP transfiere al LPS al correceptor CD14 anclado a la membrana plasmática. El CD14 presenta el LPS a el MD2. Cuando se forma el heterodímero TLR4-MD2-LPS, inicia la cascada de señalización intracelular en el dominio TIR con el reclutamiento de la proteína adaptadora que contienen el dominio TIR (TIRAP) y, posteriormente, la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) (Ain et al., 2020). En ausencia de TIRAP se puede reclutar al adaptador relacionado con TRIF (TRAM) y después a la proteína TRIF (Ain et al., 2020).

La señalización del TLR4 es compleja. La MyD88 es una proteína adaptadora que se une por interacciones homotípicas al receptor TLR4 unido a su ligando. Esta molécula acopla al receptor con la familia de las cinasas asociadas al receptor de interleucina 1 (IRAK), IRAK1,2 y 3, para llevar a cabo la activación del factor asociado a TNF 6 (TRAF6). Esta última molécula se autoubiquitina y estimula a la cinasa activada por el factor de crecimiento transformante beta 1 (TAK1) (Kong y Ge, 2008; Ain et al., 2020). En este punto, la señalización se divide en dos partes. Por un lado, se induce la activación de las MAPKs, ERK1/2, JNK y p38 que activan al factor de transcripción AP-1, y, por otro lado, se activa a la cinasa del complejo inhibidor del factor κ B (IKK α/β) que induce la activación del factor de transcripción NF- κ B (Miller et al., 2012a; Ain et al., 2020). Ambos factores de transcripción producen citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 (Fig. 7).

Para que las citocinas se secreten al espacio extracelular se necesita la activación de dos proteínas SNAREs, estas proteínas median la fusión entre las vesículas y las membranas. En células cebadas la sintaxina 4 y SNAP-23 participan activamente en este proceso (Madera-Salcedo et al., 2013; Quentin et al., 2018). Por otro lado, el receptor TLR4 es capaz de reclutar a la cinasa de tirosinas (Syk), la cual activa a la fosfoinositol-3 cinasa (PI3K), que a su vez activa a la NADPH oxidasa, produciendo especies reactivas de oxígeno (Miller et al., 2012; Nishida et al., 2010). Se ha demostrado que la señalización de Syk depende de la internalización del receptor TLR4. El promotor de dicha internalización es el correceptor CD14 (Miller et al., 2012; Zanoni et al., 2011; Zanoni y Granucci, 2013).

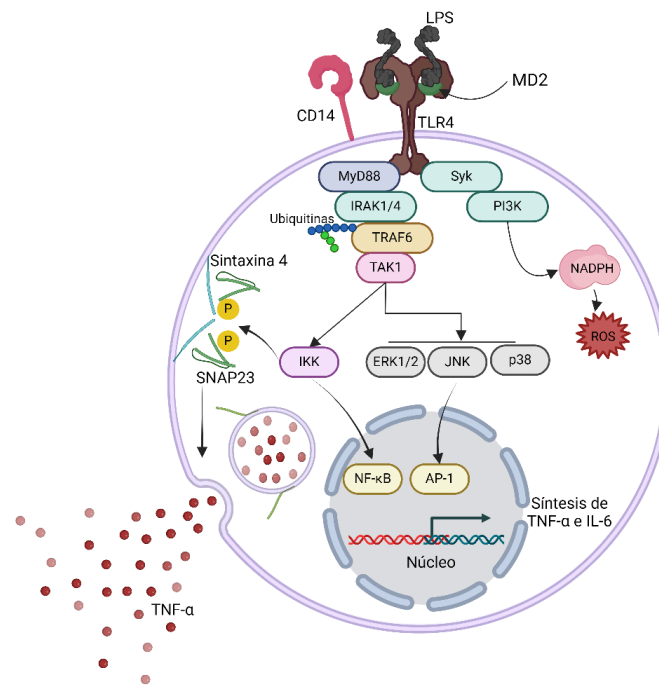


Figura 7. Señalización del receptor TLR4. El LPS se une al receptor TLR4 con la participación de CD-14. El MD2 ayuda a formar el dímero del receptor cuando el LPS se une. El dímero tiene diferentes cascadas de señalización. Una de ellas, mediada por la proteína TIRAP, activa a MYD88 que, a su vez, ubiquitina a TRAF6. Esta señalización se bifurca en dos: 1) activación de MAPKs y 2) fosforilación de IKK α/β . En este caso, IKK α/β activa a la sintaxina 4 y SNAP-23, lo que lleva a la secreción de TNF- α . También, el receptor TLR4 es capaz de reclutar a Syk y con ello activar a la NADPH oxidasa que induce la formación de ROS.

La secreción exacerbada de mediadores inflamatorios puede causar daño tisular. Para ayudar a prevenir esto tiene que haber un control de la señalización del

receptor TLR4. Cuando hay una estimulación de LPS por mucho tiempo, el receptor TLR4 se desensibiliza (tolerancia a endotoxina), reduciendo su capacidad de responder a un nuevo reto de LPS (Biswas y Lopez-Collazo, 2009; Espinosa-Riquer et al., 2020). En la tolerancia a endotoxina participan proteínas inhibitorias como la cinasa 3 asociada al receptor de interleucina-1 M (IRAK-M) y la fosfatasa de fosfatidilinositol (SHIP1), entre otras (Kobayashi et al., 2002; Sly et al., 2004). También, hay evidencia de que la tolerancia a endotoxina se puede dar por otro tipo de agonistas del TLR4, por otros TLRs, o por otros receptores como el receptor a cannabinoides tipo 2 (CB2). A este mecanismo se le conoce como tolerancia cruzada, tolerancia o desensibilización heteróloga (Espinosa-Riquer et al., 2019, 2020; Saturnino et al., 2010).

Diferentes investigaciones han reportado que los opioides son capaces de unirse y activar al receptor TLR4 (Hutchinson et al., 2010; Stevens et al., 2013; Watkins et al., 2009). Se ha visto que la morfina y el fentanilo inducen la transcripción del RNAm de IL-1 β , del TLR4 y de MD2 en células endoteliales del SNC, la activación de células gliales, y la activación del NLRP3 en astrocitos, aparentemente a través del receptor TLR4 (Carranza-Aguilar et al., 2020; Wang et al., 2012). Por otro lado, se ha observado que hay una interacción entre los receptores μ y TLR4, y que el efecto depende del tipo de célula donde se encuentren los receptores y los ligandos. Se ha observado que la activación simultánea del receptor μ -opioide por la morfina y del TLR4 por el LPS, en cultivos de microglía, induce la producción de óxido nítrico sintasa, de la ciclooxygenasa 2, de IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Cuitavi et al., 2023; Gessi et al., 2016; Merighi et al., 2013). Finalmente se ha reportado que el receptor μ es capaz de interferir con la señalización del receptor TLR4 cuando este último se activa primero (Stevens et al., 2013), impidiendo la secreción de mediadores inflamatorios. Estos efectos se han observado en un tipo particular de células del sistema inmune innato, las células cebadas. (Madera-Salcedo et al., 2011, 2013)

1.8 Células cebadas

Las células cebadas fueron descubiertas por Paul Ehrlich en 1878 gracias a su fascinación por la tinción de anilina. Desde ese momento, las células cebadas

cobraron gran relevancia por ser esenciales para las reacciones alérgicas, actuar activamente en la defensa contra patógenos, participar en la homeostasis tisular, mediar la interacción del sistema inmune innato y adaptativo y desempeñar un papel clave en el crecimiento tumoral.

Las células cebadas se encuentran en todos los tejidos vascularizados del cuerpo, principalmente en mucosas, piel, tejidos conectivos, peritoneo y cavidad torácica, lo que les permite responder al primer contacto con patógenos (da Silva et al., 2014). Las células cebadas constituyen un linaje celular presente en el cuerpo desde la etapa fetal. En esta etapa, las células cebadas provienen del saco vitelino y, en la adultez, de células hematopoyéticas (Bosveld et al., 2023; Gentek et al., 2018). Las células cebadas necesitan diferentes factores para poder diferenciarse, madurar y sobrevivir. Entre ellos se encuentra el factor de células madre (Stem-cell factor; SCF), que es ligando del receptor c-Kit (CD117) y también de la IL-3 (Galli et al., 2011). Las células cebadas maduran y crecen en los tejidos donde residen; su diferenciación y diversidad fenotípica depende del tejido donde se encuentren (Moon et al., 2010). Se ha observado que el desarrollo de las células cebadas es el mismo en humanos y ratones (Bosveld et al., 2023). Las células cebadas pueden ser activadas por diversos estímulos y liberar diferentes mediadores inflamatorios dependiendo del receptor que se active. Entre los mediadores liberados se encuentran la histamina, proteasas, enzimas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metabolitos del ácido araquidónico, especies reactivas de oxígeno e interleucinas. Estos mediadores inflamatorios se encuentran almacenados en gránulos electrodensos característicos de estas células (Moon et al., 2010).

Se distinguen dos subpoblaciones de células cebadas (Fig.8), dependiendo del tejido donde maduran y residen. La primera diferencia entre ellas radica en el contenido de heparina, histamina, triptasa y quimasa. En las células cebadas de tejido conectivo se encuentran altas concentraciones de heparina e histamina, triptasa y quimasa; mientras que en las células cebadas de tejido mucosal hay niveles bajo de histamina, triptasa y quimasa (Galli et al., 2011). También se diferencian por la expresión de receptores. Por ejemplo, las células cebadas de

tejido conectivo expresan a los receptores TLR2/6, a la integrina $\alpha\beta_3$ y al receptor MRGPRX2, pero no expresan al receptor TLR4. Por otro lado, las células cebadas mucosales expresan al receptor TLR4, al receptor TLR2/6, a la integrina $\alpha_2\beta_1$ y al receptor purinérgico P2X7 (West y Bulfone-Paus, 2022). En el laboratorio y en esta tesis se trabajó únicamente con células cebadas de tipo mucosal las cuales se obtienen de células precursoras de médula ósea en un medio de cultivo suplementado con IL-3.

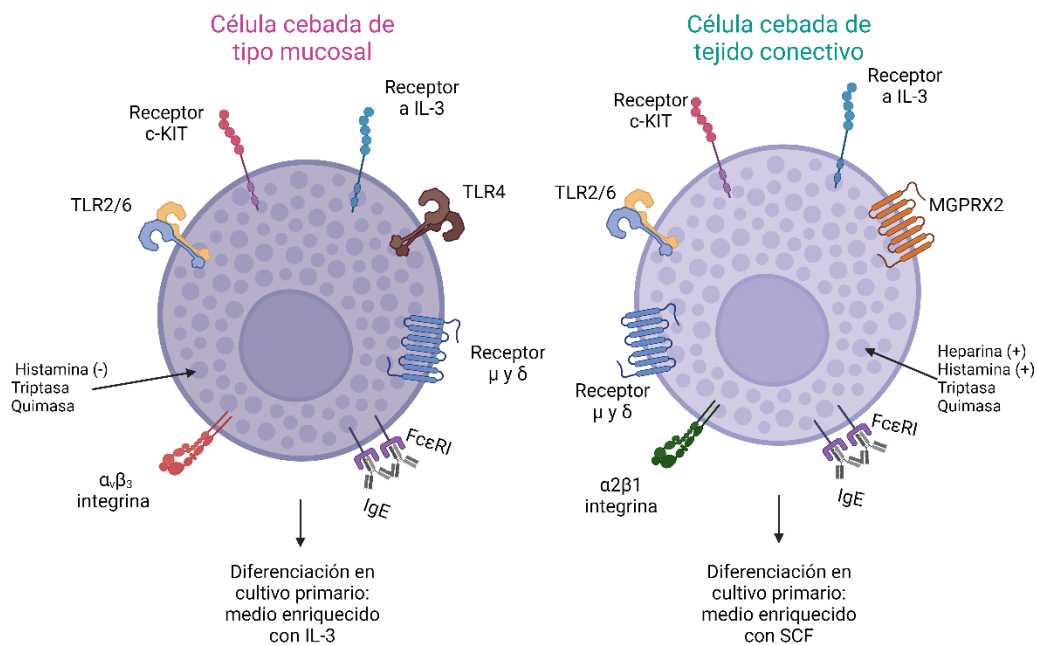


Figura 8. Célula cebada de tejido mucosal y tejido conectivo. Existen dos subpoblaciones de células cebadas, las de tejido mucosal y de tejido conectivo. Las células cebadas de tejido mucosal expresan a los receptores c-Kit, al receptor para IL-3, al TLR4, al TLR2/6, al receptor μ -opioides y a la integrina $\alpha\beta_3$. También presentan gránulos con poco contenido de histamina, contenido normal de triptasa y quimasa. En el laboratorio, estas células se pueden obtener por medio de células derivadas de la médula ósea con medio enriquecido con IL-3. Por otro lado, las células cebadas de tejido conectivo expresan receptores como los receptores c-Kit, al receptor para IL-3, el TLR2/6, al MRGPRX2 al receptor μ -opioides y a la integrina $\alpha_2\beta_1$. Sus gránulos tienen alto contenido de heparina e histamina, triptasa y quimasa. En el laboratorio se obtienen con medio enriquecido con SCF.

Las células cebadas expresan diferentes receptores en la membrana celular y en el medio intracelular. Un receptor expresado en todos los tipos de células cebadas es el receptor de alta afinidad para la IgE (Fc ϵ RI), que tiene un papel crucial en las reacciones de hipersensibilidad tipo I, mediadas por anticuerpos IgE. También, sirve como marcador de diferenciación en cultivos de células cebadas derivadas de

médula ósea (BMMCs). El receptor FcεRI desencadena diferentes cambios en las células cebadas. Por ejemplo, cuando se une únicamente la IgE monomérica al receptor FcεRI, las células cebadas sintetizan mediadores lipídicos y citocinas que almacenan en sus gránulos, proceso conocido como sensibilización celular. Cuando se une el complejo IgE/antígeno al receptor FcεRI hay una desgranulación anafiláctica, dada por la secreción de todo el contenido de los gránulos, reacción característica de las reacciones de hipersensibilidad tipo I (Espinosa-Riquer et al., 2020; Moon et al., 2010; Nagata y Suzuki, 2022).

El proceso de secreción de mediadores inflamatorios en las células cebadas depende del estímulo (Fig. 9). Estos procesos se clasifican en tres tipos: desgranulación anafiláctica, desgranulación picemal y secreción de compuestos constitutivos (tabla 3) (Espinosa-Riquer et al., 2020; Nagata y Suzuki, 2022). Se ha observado que, en respuesta a la sensibilización celular y al reto con el LPS, se da una desgranulación picemal.

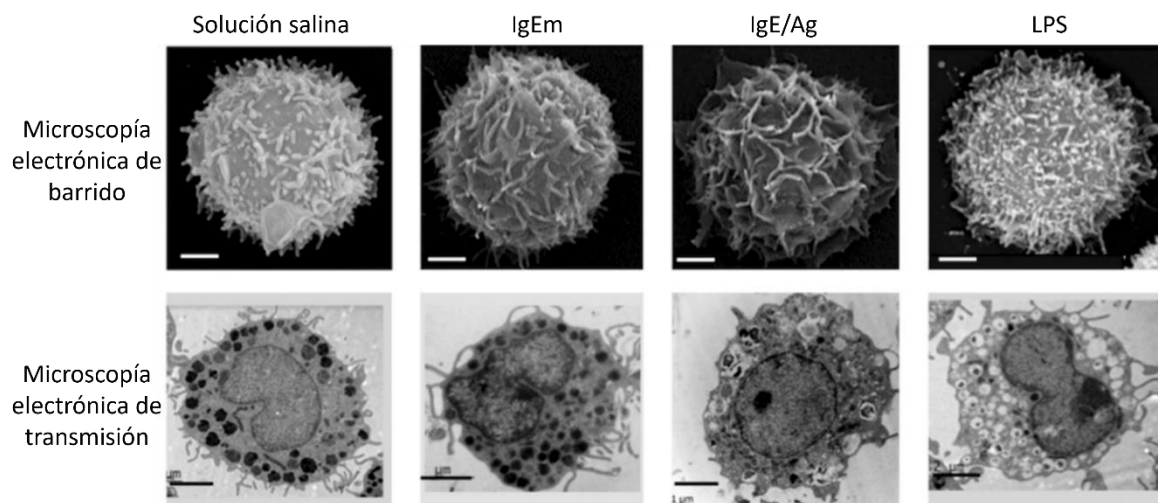


Figura 9. Secreción de moléculas en las células cebadas por diferentes estímulos. Las BMMCs tratadas con solución salina, IgE monomérica (IgEm), el complejo IgE/antígeno (IgE/Ag), y IgEm más LPS de *Escherichia coli*. La célula cebada con solución salina presenta gránulos electrodensos. La célula cebada tratada con IgEm aumenta el contenido granular y los pliegues en la membrana plasmática. La célula cebada tratada con el complejo IgE/Ag secreta todo el contenido granular. La célula cebada tratada con LPS induce desgranulación picemal de los mediadores formados por la sensibilización con IgE. Imagen tomada y modificada de Espinosa-Riquer et al., 2020.

Tabla 3. Procesos de secreción de moléculas en las células cebadas.

| Característica | Desgranulación anafiláctica | Desgranulación picemal | Secreción de compuestos constitutivos |
|-----------------------------------|--|---|---|
| Tiempo y magnitud de la secreción | Secreción rápida (min) de compuestos por fusión de gránulos con la membrana plasmática | Desgranulación gradual de los gránulos secretores. Requiere más tiempo (h). | Producción de mediadores nuevos secretados por vesículas formadas en la red del trans-Golgi. Requiere varias horas. |
| Receptor involucrado | FcεRI MGPRX2 | TLR4 | TLR4 FcεRI |

La defensa contra patógenos por parte de las células cebadas ocurre principalmente mediante la activación del receptor TLR4. Cuando se activa este receptor, ocurre una desgranulación picemal de mediadores inflamatorios. La relevancia de las células cebadas en la defensa contra patógenos se ha descrito en diferentes modelos de animales. En los ratones que carecen de células cebadas disminuye la migración de neutrófilos al sitio de infección. Por otro lado, si estos ratones se someten a una infección en el intestino por bacterias Gram negativas mueren rápidamente (Echtenacher et al., 1996; Malaviya et al., 1996). Las células cebadas participan en otros procesos que contribuyen a la defensa del organismo, entre ellos, la formación de trampas extracelulares de ADN (Möllerherm et al., 2016; Pertiwi et al., 2019). Por lo tanto, el buen funcionamiento de las células cebadas es fundamental para la homeostasis del huésped. Las células cebadas expresan diversos GPCRs como los receptores a cannabinoides tipo 1 y 2 (CB1 y CB2), el receptor μ , el receptor δ y el MGPRX2 (Espinosa-Riquer et al., 2019, 2020; Madera-Salcedo et al., 2013).

Para poder estudiar el papel de las células cebadas (CCs) en diferentes procesos se han desarrollado diferentes aproximaciones en el laboratorio, como el cultivo primario de estas células a las que se les denomina Bone Marrow Derived Mast cells (BMMCs). En el laboratorio se utilizan BMMCs de tipo mucosal, que se diferencian por la presencia de IL-3 en el medio celular (Wang et al., 2021). Para estudiar de forma *in vivo* a las células cebadas se han desarrollado diferentes

modelos y aproximaciones experimentales en ratones. Entre ellas están los ratones carentes de células cebadas gracias a una mutación en el gen *c-Kit* que es una inversión de 3.7 megabases de nucleótidos (Berrozpe et al., 1999; Reber et al., 2015). Finalmente, en este trabajo se utilizaron BMMCs carentes del receptor TLR4, los cuales provienen de ratones con ausencia del gen *Tlr4* y se conocen como TLR4^{LPS/del} (Author G, et al., 1998).

1.9 Efecto de los opioides sobre las células cebadas

Hay pocos estudios sobre los efectos de los opioides en células cebadas. Por ejemplo, la morfina y el fentanilo aumentan el calcio intracelular y la secreción de mediadores inflamatorios, en líneas de células cebadas humanas (LAD2) con sobreexpresión del receptor MGPRX2 (Lansu et al., 2017). La infusión intratecal de morfina por 20 días en ratones se indujo la activación de células cebadas de tipo conectivo y la secreción de β -hexosaminidasa y de histamina, lo que resultó en la formación de un granuloma intratecal. Estos efectos no estuvieron mediados por el receptor μ , sino por el receptor MGPRX2 (Zhang et al., 2019).

En nuestro laboratorio se ha observado que la administración aguda de morfina y fentanilo inhibe la secreción de TNF- α en respuesta al LPS en células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones y se desarrolla tolerancia a este efecto con administraciones repetidas de morfina (Madera-Salcedo et al., 2011). Por otro lado, la administración repetida de fentanilo no sólo lleva a la pérdida del efecto inhibitor, sino que incluso aumenta la secreción de TNF- α en respuesta al LPS (Molina-Martínez et al., 2014). La diferencia en los efectos de las administraciones repetidas de morfina y fentanilo podría deberse a una señalización intracelular diferente o al agonismo sesgado de estos fármacos. Sin embargo, se requieren más estudios para entender las diferencias entre estos opioides. Por otro lado, se desconocen los efectos de la metadona sobre las células cebadas del peritoneo.

Estudios en BMMCs han demostrado que: 1) el fentanilo aumenta la interacción del receptor μ y la β -arrestina2 después de un minuto de su administración; y 2) la morfina aumenta esta unión, pero lo hace hasta los 10 min (Martínez-Cuevas et al.,

2019). Lo anterior indica que los tiempos de exposición a los opioides son fundamentales para su estudio.

Respecto a la inmunosupresión *in vitro*, la morfina inhibe la secreción de TNF- α inducida por la estimulación del TLR4 con LPS en BMMCs (Fig. 10). La estimulación en BMMCs con 1 mM de morfina durante 30 min conduce a la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6 que impide la activación de TRAF6, ERK1/2, IKK α/β y SNAP 23, y con ello, se inhibe la secreción de TNF- α . Esta inhibición está mediada por los receptores opioides μ y δ (Madera-Salcedo et al., 2013). Sin embargo, se desconocen los efectos a nivel molecular del fentanilo, la metadona y de las estimulaciones prolongadas con morfina, fentanilo y metadona en BMMCs. En la tabla 3 se enlistan los principales efectos descritos de morfina, fentanilo y metadona en BMMCs.

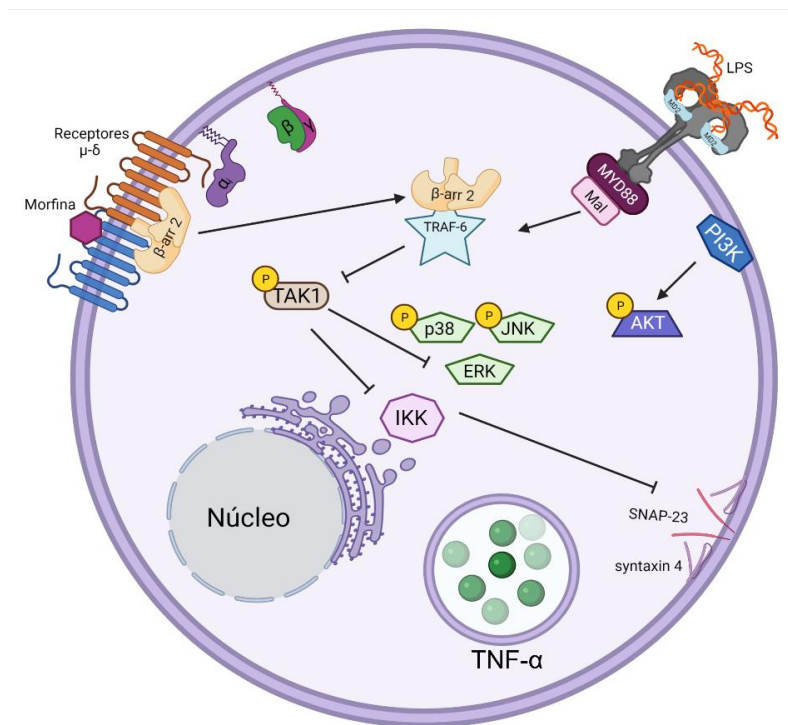


Figura 10. La morfina inhibe la señalización del receptor TLR4. En BMMCs, la morfina activa a los receptores μ y δ , conduciendo a la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6. La formación de este complejo inhibe la señalización del receptor TLR4 activado por el LPS. Esto impide la activación de IKK α/β , ERK1/2, SNAP-23 y sintaxina 4 (Madera-Salcedo et al., 2013).

Tabla 4. Efectos de la morfina, el fentanilo y la metadona en BMMCs.

| Efecto | Morfina | Fentanilo | Metadona | Referencia |
|---|---|--|----------|------------------------------|
| <i>In vivo - Agudo</i> | | | | |
| Secreción de TNF- α en la cavidad peritoneal de ratones | Sin efecto | Sin efecto | ND | Molina-Martínez et al., 2014 |
| Secreción de TNF- α por LPS en la cavidad peritoneal de ratones | Inhibición 10 mg/kg | Inhibición 0.1 mg/kg | ND | Molina-Martínez et al., 2014 |
| <i>In vivo – Estimulaciones repetidas</i> | | | | |
| Secreción de TNF- α | Sin efecto | Sin efecto | ND | Molina-Martínez et al., 2014 |
| Secreción de TNF- α por LPS | Tolerancia – Secreción de TNF- α | Aumento de la secreción de TNF- α | ND | Molina-Martínez et al., 2014 |
| <i>In vitro – Exposición aguda</i> | | | | |
| Muerte celular | ND | ND | ND | - |
| Secreción de TNF- α | Sin efecto | ND | ND | Madera-Salcedo et al., 2013 |
| Secreción de TNF- α por LPS | Inhibición 1 mM | ND | ND | Madera-Salcedo et al., 2013 |
| La inhibición de TNF- α por LPS depende de los receptores opioides | Receptor μ y δ | ND | ND | Madera-Salcedo et al., 2013 |
| Fosforilación de MAPKs y otras cinasas | ERK1/2, JNK y AKT | ND | ND | Madera-Salcedo et al., 2013 |
| Inhibición de la fosforilación de MAPKs y otras cinasas por el LPS | ERK1/2 e IKK α/β | ND | ND | Madera-Salcedo et al., 2013 |
| Formación del complejo β -arrestina2/TRAF6 | Si | ND | ND | Madera-Salcedo et al., 2013 |
| <i>In vitro – Exposición prolongada</i> | | | | |
| Muerte celular | ND | ND | ND | - |
| Secreción de TNF- α | ND | ND | ND | - |
| Secreción de TNF- α por LPS | ND | ND | ND | - |
| Muerte celular | ND | ND | ND | - |

ND: no determinado

2. Planteamiento del problema

Los opioides actúan sobre el sistema inmune y sus efectos dependen del tipo celular, el agonista utilizado y del tiempo de exposición. En particular:

- 1) La administración aguda de morfina o fentanilo inhibe la secreción de TNF- α en respuesta al LPS en las células cebadas de la cavidad peritoneal.
- 2) La administración repetida de morfina induce tolerancia a su efecto inhibitor sobre la secreción de TNF- α inducida por el LPS. La administración reiterada de fentanilo no sólo induce tolerancia, sino que aumenta la secreción de TNF- α en respuesta al LPS en células cebadas de la cavidad peritoneal.
- 3) Los receptores μ y δ participan en la inhibición que la morfina ejerce sobre la secreción de TNF- α por el LPS.
- 4) La estimulación aguda con morfina induce la formación de un complejo β -arrestina2/TRAF6 e inhibe la fosforilación de IKK α/β y de SNAP 23 dependiente del receptor TLR4, lo cual impide la secreción de TNF- α inducida por el LPS en BMMCs.
- 5) Los opioides inducen diferentes tipos de muerte celular mediados por los receptores μ y TLR4.

Se desconocen los efectos del fentanilo y la metadona sobre la señalización intracelular de los receptores μ y TLR4 y la posible muerte celular causada por fentanilo o metadona en células cebadas.

Con base en estos antecedentes, la presente investigación se centró en el estudio de los efectos sobre la señalización y la posible muerte celular producidos por distintos esquemas de exposición con fentanilo y metadona sobre las BMMCs.

3. Hipótesis

General

El fentanilo y la metadona, al igual que la morfina, inhibirán la señalización del receptor TLR4 mediante la activación del receptor μ en las células cebadas, con diferencias en las concentraciones eficaces y los tiempos de estimulación. Los tres opioides, a concentraciones altas y tiempos de estimulación prolongados, producirán muerte celular mediada por los receptores μ y TLR4.

Específicas

- 1) La estimulación aguda con fentanilo o metadona inhibirá la señalización del TLR4 en BMMCs y en células cebadas de la cavidad peritoneal.
- 2) La exposición prolongada a morfina o metadona generará tolerancia al efecto inhibitor de esos opioides sobre la señalización del TLR4 en BMMCs.
- 3) La exposición prolongada a fentanilo aumentará la señalización del TLR4, en BMMCs.
- 4) La morfina, el fentanilo y la metadona, en concentraciones altas, inducirán la muerte en BMMCs.

4. Objetivos

Objetivo General

Conocer los efectos de diferentes esquemas de administración de morfina, fentanilo y metadona sobre el sistema de señalización del receptor TLR4 en células cebadas

Objetivos Particulares

1. Estandarizar las condiciones experimentales *in vitro* para la exposición aguda y prolongada a morfina, fentanilo y metadona, analizando sus efectos sobre la secreción de TNF- α inducida por el LPS en BMMCs.
2. Evaluar los efectos de la administración aguda y repetida de dosis analgésicas de metadona sobre la liberación de TNF- α inducida por el LPS en células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones.
3. Analizar algunos puntos de la señalización del TLR4 afectados por la exposición aguda y prolongada a morfina, fentanilo y metadona en BMMCs.
4. Determinar la participación de la β -arrestina2 en los efectos inhibitorios de los opioides sobre la señalización del TLR4 en BMMCs.
5. Estudiar si los opioides utilizados en este estudio producen muerte celular en BMMCs.

5. Materiales y métodos

5.1 Animales

Se utilizaron ratones macho y hembra C57BL/6J silvestres (No. de stock 000664), ratones B6.B10ScN-TLR4^{LPS/del}JthT (No. de stock 007227) carentes del receptor TLR4 (TLR4^{LPS/del}), ratones c-Kit^{W-sh/W-sh} (No. de stock 005051) carentes de células cebadas y ratones c-Kit^{W-sh/W-sh} reconstituidos con BMDCs. Los animales se adquirieron de Jackson Laboratory (Maine). Se mantuvieron en un ciclo 12/12 h de luz-oscuridad, a una temperatura de 22 ± 2° C, con humedad controlada y libre acceso a agua y comida. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de cuidado y manejo de animales (NOM- 062-ZOO-1999) y los aprobó el comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio bajo el protocolo CICUAL-0137-15.

5.2 Fármacos y reactivos

Los fármacos utilizados incluyeron sulfato de morfina, citrato de fentanilo y clorhidrato de metadona (donados por el Instituto Nacional de Abuso de Drogas (NIDA) Carolina del Norte y Laboratorios Psicofarma (México). Los antagonistas del receptor μ utilizados fueron el clorhidrato de naloxona (antagonista competitivo inespecífico de los receptores opioides; No. de catálogo N-7758), el CTAP (antagonista selectivo del receptor μ ; No. de catálogo C-6352), clorhidrato de β -funaltrexamina (β -FNA; antagonista irreversible selectivo del receptor μ ; No. de catálogo 72786-10-8), el PMA (inductor de muerte celular; No. de catálogo P-1585) y el LPS de *Escherichia coli*, todos ellos de Sigma Aldrich (San Luis, MO). Los opioides se disolvieron en solución salina estéril al 0.9 %, el PMA en 10% de DMSO (No. de catálogo D8418). El antioxidante Trolox (No. de catálogo 648471) y el quelante de calcio el ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA; Merck Millipore 2787) se obtuvieron de Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

Los reactivos para los análisis de muerte celular fueron: el reactivo de viabilidad y conteo Muse (No. de catálogo MCH100104) de Cytek Biosciences (california) y el yoduro TO-PRO™-3 (No. de catálogo T3605) de ThermoFisher Scientific (Waltham). La 2´7´diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA; No. de catálogo 2044-85-1) y el Fura 2-AM (No. de catálogo 108964-32-5) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El medio de cultivo RPMI 1640 (No. de catálogo R4130), el suero bovino fetal (FBS; No. de catálogo 26140079), la penicilina (No. de catálogo 15140122), la mezcla de antibiótico/antimicótico (No. de catálogo 15240062), el piruvato (No. de catálogo 11360070), los aminoácidos no esenciales (No. de catálogo 11140050), la albumina de suero bovino (BSA) y el medio de montaje Prolong™ Diamond Antifade (No. de catálogo P36970) se compraron en Invitrogen (Waltham). El kit de ELISA para TNF- α murino (No. de catálogo 900-K54) y la interleucina 3 murina recombinante (IL-3; No. de catálogo 213-13x) fueron adquiridos de Peprotech (Waltham).

Las características de los anticuerpos utilizados en este trabajo se resumen de la siguiente tabla:

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

| Anticuerpo | Dilución | No. de catálogo y casa comercial |
|---|---------------------|---|
| Anti FcεRI cadena α | 1/2000 | Life Biosciences / 17-5898-80 |
| Phospho-p44/42 mapk (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) | 1/20000 | Cell Signaling / 9101 |
| Peroxidase affini-pure goat anti-rabbit IgG (H+L) | 1/20000 and 1/10000 | Jackson ImmunoResearch / 111-035-003 |
| Anti-actin, clone actbd11b7 | 1/10000 | Santa Cruz Biotech. / sc-81178 |
| Peroxidase affini-pure goat anti-mouse IgG (H+L) | 1/10000 | Jackson ImmunoResearch / 115-035-003 |
| Anti-phospho-AKT (Ser473) | 1/10000 | Cell Signaling / 9271 |
| Anti-IKKα/β | 1/10000 | Cell Signaling / 2697S |
| Anti-β-arrestina2 | 1/5000 | Santa Cruz Biotech / sc-365445 |
| Peroxidasa IgG fracción monoclonal mouse anti-goat IgG light chain specific | 1/15000 | Jackson ImmunoResearch / 205-032-176 |
| Anti-TRAF6 | 1/5000 | Santa Cruz Biotech / sc-7221 |
| Anti-histona (citrulinada R2 + R8 + R17) | 1/350 | Abcam / ab2478 |
| Anti-Mast cell tryptase | 1/300 | Santa Cruz Biotechnology / SC-32889 |
| Anti-ratón CD284 (TLR4) | 1/300 | BioLegend / 145401 |
| Anti-receptor μ-opioide | 1/350 | R&D Systems / MAB86629 |
| Burro anti-conejo Alexa 568 | 1/400 | Invitrogen / A10042 |
| Burro anti-conejo Alexa 488 | 1/400 | Invitrogen / A21206 |
| Burro anti-ratón Alexa 647 | 1/400 | Life Technologies / A31571 |
| Burro anti-rata Alexa 594 | 1/400 | Life Technologies A21209 |

5.3 Cultivo de BMDCs

La médula ósea se aisló de la tibia de ratones WT o TLR4^{LPS/del} de 5 a 6 semanas de edad. Posteriormente, se incubó en 30 mL de medio RPMI suplementado con 3 ml de FBS, 20 ng/mL de IL-3, 20 mM de HEPES, 1x de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato, 100UI/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomicina. Para los cultivos TLR4^{LPS/del} se añadieron también 10 mg/mL de SCF. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C con 5% de CO₂, con cambio de medio cada semana. Después de 5 a 6 semanas, se obtuvieron las BMDCs maduras, monitoreadas mediante citometría de flujo usando el anticuerpo específico contra la cadena α del receptor FcεRI. Solamente se utilizaron los cultivos con 98% o más de células positivas. Para los experimentos *in vitro*, todas las BMDCs se sensibilizaron con 100 ng/mL de IgE anti-DNP monoclonal por al menos 18 h.

5.4 Pruebas de viabilidad

Se utilizaron dos pruebas de viabilidad celular. En la primera, las células se resuspendieron en PBS 1x. Después del reto con los opioides, se añadió el reactivo The Muse® count & viability kit (Cytek Biosciences; California) y las células se analizaron en el equipo Guava® Muse® (Cytek Biosciences; California) que detecta las células vivas mediante fluorescencia y citometría microcapilar. Los parámetros obtenidos fueron: 1) recuento celular viable (células/mL); 2) recuento celular total (células/mL) y 3) porcentaje de viabilidad de la muestra. Este último fue el parámetro graficado en los resultados.

La segunda estrategia fue utilizar citometría de flujo. Después del tratamiento con metadona o PMA, las BMDCs se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, se resuspendieron en 100 mL de PBS 1x y se agregó 0.1 µL del reactivo TO-PRO™-3. Las células se analizaron en el citómetro de flujo Cytoplex S (Beckman Coulter; California), y se procesaron con el software FlowJ 10.8.1. El TO-PRO™3 es un intercalante de ácidos nucleicos de doble cadena. Dado que no cruza las membranas intactas, esto lo convierte en un indicador de muerte celular. Este reactivo tiene una $\lambda_{\text{excitación/emisión}} = 642/661$ nm.

5.5 Detección de TNF- α mediante ELISA

Para las pruebas *in vitro*, se utilizó el sobrenadante celular y el kit para detección de TNF- α murino (Peprotech; Waltham), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores graficados se muestran en picogramos por cada millón de células utilizadas (pg/10⁶ células). Por otro lado, para los experimentos *in vivo* se utilizaron lavados peritoneales. Los resultados se graficaron en pg por lavado peritoneal (pg/lp).

5.6 Western blot

Después del reto con los opioides, un millón de BMMCs se centrifugaron a 250x g y lisaron con 100 μ L de buffer Laemmli suplementado con ortovanado (4 mM). El lisado celular se separó mediante geles al 10% de acrilamida y se transfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Posteriormente, las membranas se bloquearon con blotting-Grade Blocker (Bio-Rad; California) al 5% e incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche. Después de la incubación, las membranas se lavaron tres veces con buffer de solución salina con tris (TBS) y 0.1% de Tween 20 e incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente. Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces y las bandas de proteínas detectadas con el sustrato HRP. Se utilizó el software Gel Quant Express para la cuantificación de lo inmunoblots mediante densitometría.

5.7 Inmunoprecipitación

Después de los estímulos con los opioides y el LPS, se centrifugaron diez millones de BMMCs a 250xg y lisaron con 500 μ L el buffer de lisis que contiene: 411 μ L de PBS 1x, 1 μ L de leupeptina, 1 μ L de pepstatina, 2 μ L de aprotinina, 2.5 μ L de PMSF, 25 μ L de pirofosfato de sodio, 2.5 μ L de ortovanado y 50 μ L de β -octil-G. Para la precipitación de la proteína deseada, se utilizaron 40 μ L de perlas de proteína de G-agarosa con 10 μ L de anticuerpo primario (Ab para TRAF6) y 600 μ L de PBS 1x, e incubadas toda la noche con rotación. Después de la incubación, las perlas se lavaron 2 veces con PBS 1x y se añadió el lisado celular, incubándose toda la noche con rotación. Para eliminar el exceso de muestra, las perlas se lavaron 2 veces con el buffer de lisis y se añadieron 50 μ L del buffer Laemmli suplementado con

ortovanado (4 mM). Las muestras se corrieron en geles al 10% de acrilamida y transfirieron a membranas de PVDF. Posterior a la transferencia, las membranas se bloquearon con blotting-Grade Blocker al 5% e incubaron con los anticuerpos primarios contra la proteína que forma el complejo con TRAF6, β -arr2, toda la noche. Tras la incubación, las membranas se lavaron 3 veces con el buffer de solución salina con tris (TBS) y 0.1% de Tween 20, y fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente. Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces y las bandas de proteínas se detectaron con el sustrato HRP. Como control de carga, se utilizó la cuantificación total de la proteína que se precipitó, en este caso TRAF6. Se utilizó el software Gel Guant Express para la cuantificación de lo inmunoblots mediante densitometría.

5.8 Inmunofluorescencia

Las BMMCs se resuspendieron en PBS 1x después de los estímulos y colocaron en portaobjetos cargados durante 20 min para permitir su adherencia. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS 1x y fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min. Las células fijadas se lavaron 3 veces con PBS 1x e incubaron con solución de bloqueo (2.5% de BSA, suero fetal de burro al 5% y PBS 1x) por 1 h. Al finalizar, las células se incubaron con los anticuerpos primarios a 4 °C en solución de bloqueo toda la noche. Al terminar la incubación, las laminillas se lavaron 10 veces con PBS 1x e incubaron 2 h con anticuerpos secundarios y DAPI en solución de bloqueo, luego se lavaron 10 veces más con PBS 1x. Al finalizar, se fijaron con el medio de montaje Prolong™ Diamond Antifade y cubrieron con un cubreobjetos. Las laminillas se guardaron a temperatura ambiente cubiertas de la luz hasta su análisis. El análisis se realizó en un microscopio confocal de la marca Zeiss LSM 800 modelo AX10 y el software ZEN 2.5 edición azul.

5.9 Microscopía electrónica de barrido

Se utilizaron un millón de BMMCs tratadas con el vehículo, la metadona o el PMA, las cuales se colocaron en portaobjetos cargados. Después de 20 min, las células se fijaron con 2.5 % de glutaraldehído por 1 h a temperatura ambiente. Al finalizar,

las muestras se lavaron tres veces con PBS 1x y post-fijaron con 1 % de tetróxido de osmio (OsO_4) durante 1 h. Las células fijadas se lavaron con PBS 1x y deshidrataron por diluciones graduales de etanol: primero etanol al 50 %, seguido de etanol al 60 % y sucesivamente con 70 %, 80 %, 90 % y 100 %, durante 10 min cada dilución. Finalmente, las muestras se

secaron en una cámara de secado al punto crítico y cubiertas por el método de oro-argón. Las células se escanearon en el microscopio electrónico de barrido JSM-6510LV (JEOL Tokyo, Japan).

5.10 Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno

La producción de especies reactivas de oxígeno se determinó con la ayuda del reactivo DCFH₂-DA. Un millón de BMMCs se incubaron con DCFH₂-DA a una concentración de 10 μM en buffer de *Tyrodex* durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron a 750 x g por 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Después, las células se resuspendieron en 500 μL de buffer de *Tyrodex* y se estimularon con metadona o PMA. Al finalizar, las células se centrifugaron a 12,000 x g por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recolectó y las células se lisaron con 300 μL de IGEPAL (0.1%). Las muestras se cargaron en una placa negra de 96 pozos y finalmente se leyeron en el luminómetro de microplacas BioTek (FLx800, Biotek, Winooski, VT) a $\lambda_{\text{excitación/emisión}} = 488/565$ nm. En este estudio, las especies reactivas de oxígeno intracelulares y extracelulares se muestran como unidades arbitrarias de fluorescencia normalizadas con respecto al basal.

5.11 Determinación de la concentración de calcio intracelular

La concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se determinó con el reactivo Fura 2-AM que permite medir el calcio celular por fluorescencia. Un millón de BMMCs se cargaron con 1 μM de Fura 2-AM durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con buffer *Tyrodex*/BSA, se resuspendieron en 1 mL del mismo buffer y se colocaron en una cubeta. Los cambios celulares en fluorescencia fueron determinados con el espectro-fluorómetro Fluoromax x (Jobin

Yvon, Horiba) a $\lambda_{\text{excitación/emisión}} = 340/510$ nm en intervalos de 1.16 s. Las células se mantuvieron a 37 °C y en agitación durante todo el experimento. Primero, se registró la fluorescencia celular basal por 100 s, luego las células se estimularon con metadona o PMA por 400 s más. El máximo de fluorescencia (F_{max}) de cada muestra fue determinado lisando a las células con 10% de tritón y el mínimo de fluorescencia (F_{min}) con un quelante de Ca^{2+} , EGTA (200 nM). Finalmente, el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se calculó usando el método de Grynkiewicz de acuerdo con la siguiente fórmula donde la Kd es la constante de disociación del Fura-2AM (224 nM):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = Kd \left(\frac{F - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F} \right)$$

Los datos se presentan normalizados con respecto a el vehículo.

5.12 Prueba de la plancha caliente

Esta prueba se usa para medir nocicepción. El ratón se colocó dentro de un cilindro de acrílico sobre una plancha caliente a $53 \pm 0.5^\circ$ C y se registró la latencia a la lamida de patas. La prueba tiene una duración de máximo 30 s para evitar daño tisular.

5.13 Lavados peritoneales

Para realizar los lavados peritoneales se sacrificaron los ratones en una cámara de CO_2 , se inyectaron 3 ml de solución salina en la cavidad peritoneal, se dio un suave manejo abdominal y la solución se recolectó 2 min después.

5.14 Reconstitución de ratones W-sh con BMBCs

Los ratones W-sh, carentes de células cebadas en edad adulta, se inyectaron con 2×10^6 BMBCs por vía intraperitoneal. Los ratones se utilizaron cuatro semanas después de la reconstitución. Este tiempo es suficiente para reconstituir a los animales con células cebadas en la cavidad peritoneal (Molina-Martínez et al., 2014).

5.15 Análisis estadístico

Todos los datos en las gráficas se presentan como la media \pm EEM. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa SigmaPlot (SYSTAT; Illinois Chicago).

Los datos se analizaron con ANOVA de una vía seguida de Dunnett (comparación contra el control), o la prueba Tukey (comparación entre grupos). La prueba de t de Student se utilizó para la comparación de dos grupos. En todos los casos se consideró una $p \leq 0.05$.

6. Diseño experimental

6.1 Estandarización del modelo *in vitro* para la exposición aguda y prolongada a morfina, fentanilo y metadona, analizando sus efectos sobre la secreción de TNF- α inducida por el LPS en BMDCs

El primer paso para la estandarización de la exposición aguda a morfina, fentanilo y metadona fue evaluar si los opioides por sí solos inducen la secreción de TNF- α y, posteriormente, su efecto sobre la secreción de esta citocina mediada por el LPS.

Las BMDCs se incubaron con 0.1 y 1 mM de fentanilo o metadona durante 30 min. Al finalizar, el sobrenadante se recolectó para medir la secreción de la citocina y las células se estimularon con 500 ng/mL de LPS por dos horas. El sobrenadante se utilizó para medir la secreción de TNF- α posterior al reto con LPS (Fig. 11). Como control positivo de inhibición se utilizó 1 mM de morfina por 30 min.

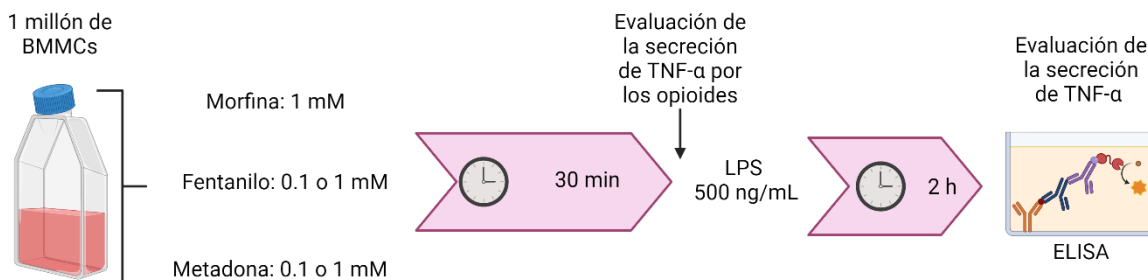


Figura 11. Evaluación de la secreción de TNF- α por exposiciones agudas de los opioides. Un millón de BMDCs se trataron con diferentes concentraciones de morfina, fentanilo o metadona durante 30 min. Después, se recolectó el sobrenadante y se evaluó la secreción de TNF- α mediante ELISA. Posteriormente, las BMDCs se retaron con LPS (500 ng/mL) durante 2 h más. Al finalizar, el sobrenadante se recolectó para evaluar la secreción de TNF- α inducida por el LPS mediante ELISA.

Con el propósito de saber si las concentraciones de los opioides utilizadas durante 30 min tenían efecto sobre la viabilidad celular, las BMDCs se sometieron a una prueba de viabilidad con el equipo Guava® Muse®.

Debido a que la concentración de 1 mM de metadona tuvo efectos sobre la viabilidad celular, se utilizó la concentración de 0.1 mM durante una hora para ver si tenía

efecto sobre la secreción de TNF- α mediada por el LPS. El estudio de la muerte celular mediada por metadona se describe más adelante.

Para las exposiciones prolongadas de los opioides, se realizó un curso temporal de la viabilidad celular con 1 mM de morfina o fentanilo y 0.1 mM de metadona durante 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h. Después de saber qué tiempos eran seguros, se determinó su efecto sobre la secreción de TNF- α mediada por el LPS (Fig. 12).

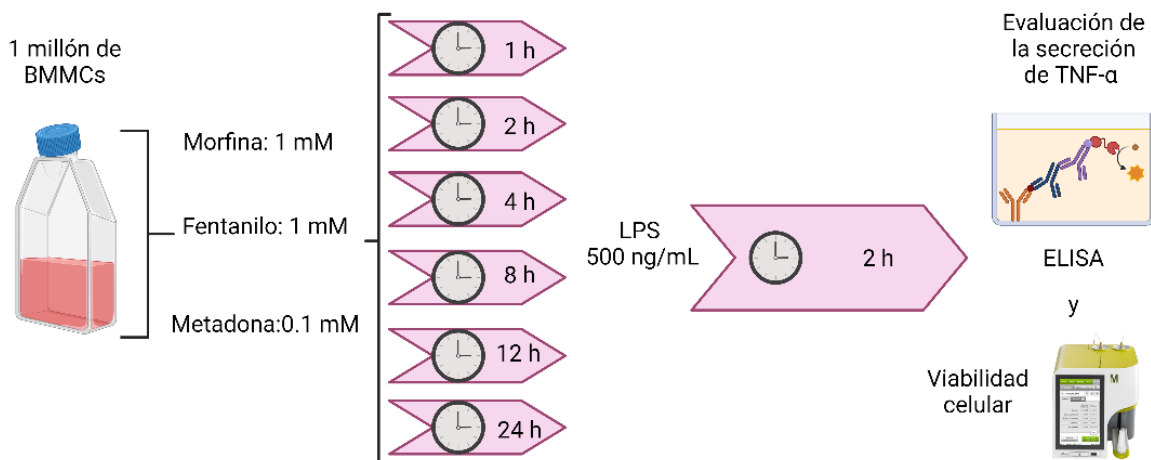


Figura 12. Estandarización de las estimulaciones prolongadas de los opioides. Un millón de BMMCs se trataron con 1 mM de morfina o fentanilo, y 0.1 mM de metadona durante 1, 2, 4, 8, 12 o 24 h. Después, se retaron con LPS (500 ng/mL) durante 2 h más. Al finalizar, el sobrenadante se utilizó para evaluar la secreción de TNF- α por ELISA y el pellet para evaluar la viabilidad celular.

6.2 Análisis de los principales puntos de la vía de señalización del TLR4 afectados por la exposición aguda y prolongada a morfina, fentanilo y metadona en BMMCs

Para determinar qué puntos de la cascada de señalización del receptor TLR4 se afectaban, las BMMCs se estimularon con fentanilo 1 mM durante 30 min o 0.1 mM de metadona durante 1 h. Al finalizar, se retaron con LPS. Se evaluó la fosforilación de las cinasas ERK1/2, AKT e IKK α / β mediante *western blot* (Fig. 13).

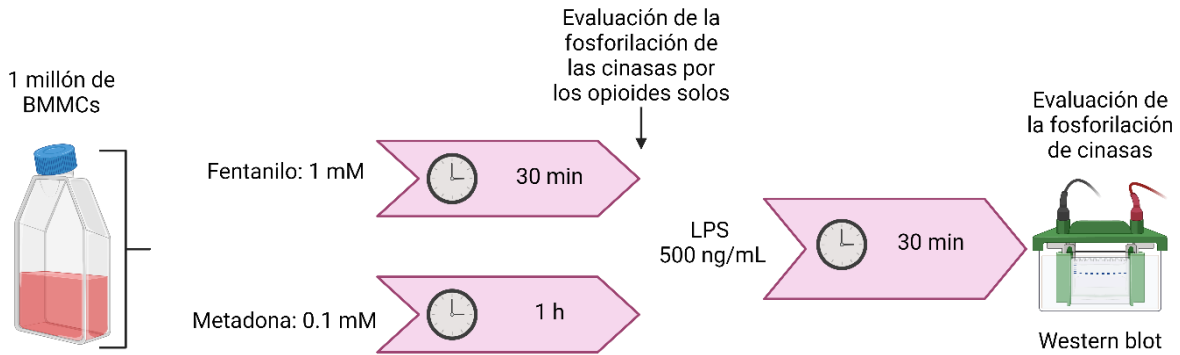


Figura 13. Evaluación de la fosforilación de cinasas por los opioides. Un millón de BMMCs se trataron con 1 mM de fentanilo durante 30 min o 0.1 mM de metadona por 1 h. Posteriormente, se retaron con LPS por 30 min. Al finalizar, se evaluó la fosforilación de las cinasas mediante *western blot*. También se evaluó la fosforilación de las cinasas por los tratamientos con los opioides solos.

6.3 Determinación de la participación de la β -arrestina2 en el efecto inhibitor de los opioides sobre la señalización del receptor TLR4 en BMMCs

Con el fin de determinar la participación de la β -arrestina2 en el efecto inhibitor de los opioides sobre la señalización del receptor TLR4, se determinó la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6. El diseño experimental fue el mismo que en el apartado 7.1.2. Como control positivo de la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6 se utilizó 1 mM de morfina durante 30 min.

6.4 Análisis de la participación del receptor μ en el efecto inhibitor de los opioides sobre el receptor TLR4

Para determinar si el receptor μ media el efecto inhibitor de fentanilo y metadona sobre la respuesta a la activación del TLR4, se utilizó un antagonista de los receptores opioides, la naloxona (NLX) y un antagonista selectivo del receptor μ -opioide, el CTAP. Las BMMCs se preincubaron con 10 μ M de naloxona o 1 μ M de CTAP durante 15 min, luego se trataron con fentanilo durante 30 min o metadona durante 1 h. Al finalizar, el sobrenadante se utilizó para cuantificar la secreción de TNF- α mediante ELISA. Como control de la participación del receptor μ , se utilizó el tratamiento de antagonistas antes de la estimulación con 1 mM de morfina.

6.5 Evaluación de los efectos de la administración aguda y repetida de dosis analgésicas de metadona sobre la liberación de TNF- α inducida por el LPS en células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones

Con el fin de determinar el efecto de la administración aguda de metadona, se evaluó qué dosis tenía efecto sobre la liberación de TNF- α mediada por el LPS en ratones WT. Se utilizaron dos dosis de metadona: 1 y 10 mg/kg. Estas dosis se administraron en la cavidad peritoneal, y 10 min después se midió su efecto antinociceptivo en los ratones. Posteriormente se les administró LPS (1 mg/kg) y, después de 60 min, se obtuvieron lavados peritoneales para medir la secreción de TNF- α (Fig. 14).

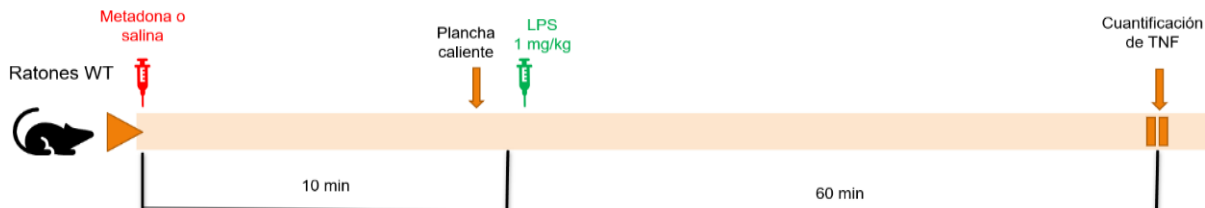


Figura 14. Esquema del tratamiento agudo de la metadona en ratones. Las dosis de 1 o 10 mg/Kg se administraron intraperitonealmente (IP) a los ratones y 10 min después se evaluó el efecto antinociceptivo mediante la prueba de plancha caliente. Posteriormente, se les administró 1 mg/Kg de LPS y 60 min después se realizó el lavado peritoneal (lp).

El estudio de la participación de las células cebadas sobre los efectos de metadona se realizó en ratones carentes de células cebadas (W-sh) y ratones W-sh reconstituidos con BMBCs. Los esquemas de administración de metadona o LPS fueron realizados de la misma manera que en el apartado anterior (7.5) para cada tipo de ratón.

Para determinar el efecto de la administración repetida de metadona, se administraron 6 dosis de 10 mg/kg, de metadona cada 8 horas a los ratones (Fig. 15). La administración de LPS (1 mg/kg, i.p.) se realizó después de 10 min de la última dosis de metadona. El lavado peritoneal se tomó una hora posterior a la inyección de LPS y se cuantificó la concentración de TNF- α mediante la técnica de ELISA.

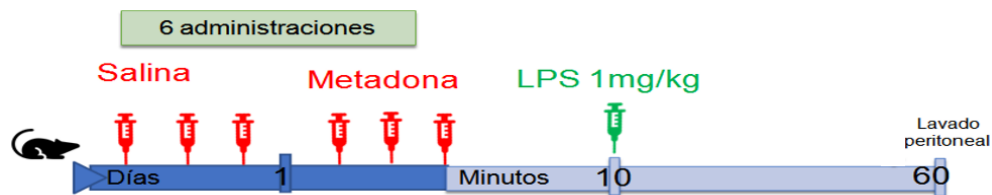


Figura 15. Esquema de la administración repetida de la metadona. Se realizaron 6 administraciones de metadona (10 mg/kg) a intervalos de 8 horas y 10 min después de la última administración se inyectó 1 mg/kg de LPS y después de 60 min se realizó el lavado peritoneal.

6.6 Estudio de la muerte celular mediada por metadona en BMMCS

Para evaluar la muerte celular inducida por metadona, primero se seleccionó el PMA como control de muerte celular. La concentración de PMA que induce muerte en BMMCs es 1 μM ; sin embargo, había dudas sobre el tiempo óptimo para inducir muerte. Por lo tanto, se realizó un curso temporal con los tiempos de 2, 4 y 8 h.

Con el fin de determinar si las concentraciones más bajas de metadona afectaban la viabilidad celular, se realizó una curva dosis-respuesta. Se estimularon las BMMCs con 0.1, 0.5 y 1 mM de metadona durante 10 min. Para determinar el tiempo en que se genera la muerte celular, se realizó un curso temporal con las concentraciones de 0.5 y 1 mM de metadona. Los tiempos evaluados fueron 30 s, 2.5, 5 y 10 min

Para determinar el tipo de muerte celular inducido por metadona, se estimuló a las BMMCs con el vehículo, el PMA, y con 0.5 y 1 mM de metadona. Los tiempos de estimulación con metadona fueron de 2.5 y 5 min. El tipo de muerte celular se determinó mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido.

Con el fin de determinar los mecanismos involucrados en la muerte celular mediada por metadona, se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno y la movilización de calcio intracelular. Para ello, se estimuló a las BMMCs con el vehículo, el PMA y 0.5 mM de metadona durante 5 min. Se utilizó un antioxidante, el trolox, y un quelante de calcio, el BAPTA, para evaluar la participación de estos mecanismos en la muerte celular. Estos compuestos se añadieron 15 min antes de la metadona.

Para determinar el papel del receptor μ en la muerte celular, la producción de especies reactivas de oxígeno y el aumento de calcio intracelular se utilizó naloxona, un agonista de los receptores opioides μ y δ , y β -FNA, un antagonista irreversible del receptor μ . Las BMMCs se incubaron 15 min con los antagonistas antes de administrar la metadona.

La participación del receptor TLR4 en la muerte celular y en los mecanismos que conducen a la muerte celular se determinó utilizando BMMCs provenientes de ratones LPS/del.

Los resultados de la citometría de flujo se graficaron como el porcentaje de células positivas de TO-PRO3 en cada muestra.

7. Resultados

7.1 Efectos de la morfina, el fentanilo y la metadona sobre la liberación de TNF- α y la viabilidad celular en BMMCs

7.1.1 El fentanilo y la metadona inhiben la secreción de TNF- α mediada por el LPS a diferentes tiempos de exposición

El fentanilo y la metadona por sí mismos no tuvieron efecto sobre la secreción de TNF- α (Fig. 16A). Sin embargo, cuando se administraron 30 min antes del LPS, los dos opioides inhibieron la liberación de TNF- α a la concentración de 1 mM (Fig. 16B).

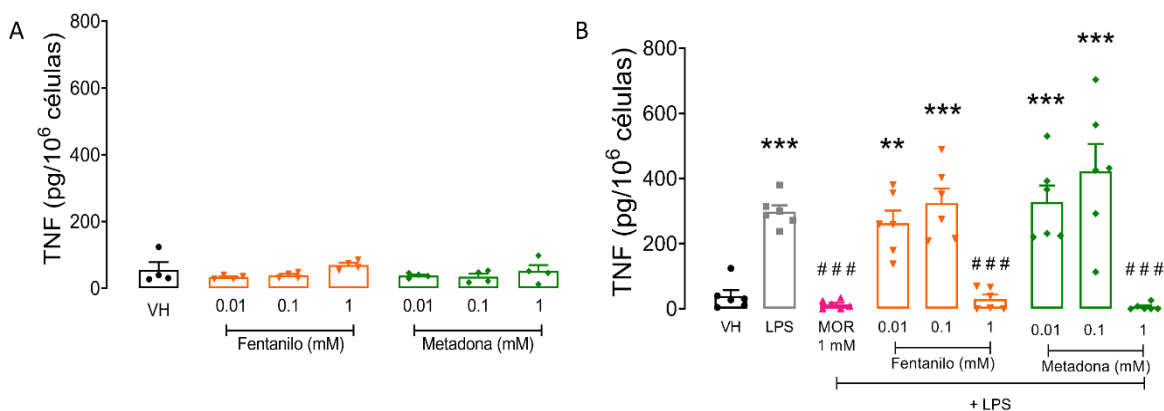


Figura 16. El fentanilo y la metadona inhiben la secreción de TNF- α mediada por el LPS. Liberación de TNF- α inducida por LPS en células control (A) tratadas con concentraciones crecientes (.01, 0.1 ó 1 mM) de fentanilo o metadona durante 2 h. B) Liberación de TNF- α inducida por LPS (500 ng/mL) en células tratadas con 1 mM de morfina (MOR), 0.01, 0.1 ó 1 mM de fentanilo o metadona durante 30 min. Las barras representan el promedio \pm EE n=4-6, ** p< 0.01 y ***p < 0.001 con respecto al vehículo (VH), ### p<0.001 con respecto al LPS; ANOVA de una vía, seguido de Dunnett.

Para descartar que la inhibición de la liberación de TNF- α por LPS se debiera a que los opioides afectaban la viabilidad de las BMMCs, ésta se evaluó en BMMCs tratadas con 0.1 y 1 mM de cada opioide durante 30 min. Sólo el tratamiento de 1 h con la concentración de metadona 1 mM indujo muerte celular (Fig. 17).

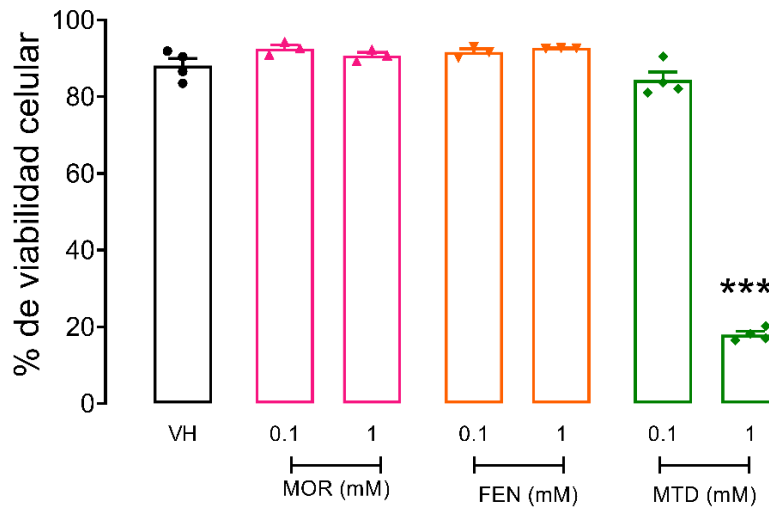


Figura 17. La metadona 1 mM disminuye la viabilidad celular. Porcentaje de viabilidad de las BMBCs incubadas durante 30 min con 0.1 ó 1 mM de morfina (MOR), fentanilo (FEN), o metadona (MTD). Las barras representan el promedio \pm EEM; n=3-4 por grupo, ***p < 0.001 con respecto al vehículo (VH); ANOVA de una vía, seguido de Dunnett.

Con base en estos resultados, se seleccionó la concentración de 1 mM de metadona para estudiar la muerte celular y la de 1 mM de fentanilo para determinar su efecto sobre la señalización del receptor TLR4.

Para estudiar el efecto de la metadona sobre la señalización celular, se evaluó una dosis menor, de 0.1 mM, pero a un tiempo mayor se observó que la exposición a esta concentración durante inhibe la secreción de TNF- α mediada por el LPS (Fig. 18).

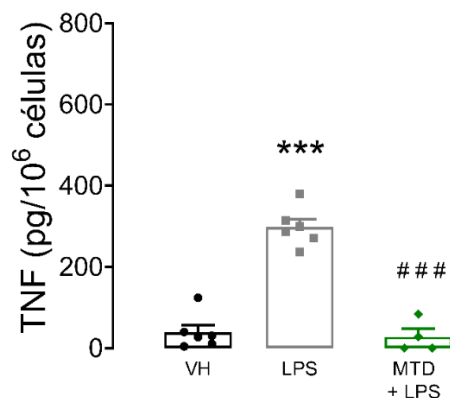


Figura 18. La metadona inhibe la secreción de TNF- α mediada por el LPS a tiempos largos de incubación. Las células se incubaron con 0.1 mM de metadona (MTD) durante 1 h y se retaron con LPS 500 ng/mL. Las barras representan el promedio \pm EE n=6-4 ***p < 0.001, con respecto al vehículo (VH); Dunnett. ### p<0.001 con respecto al LPS, t de Student.

7.1.2 Las exposiciones prolongadas de fentanilo inducen la muerte de BMBCs

Dado que la metadona tuvo efectos diferentes en función del tiempo de exposición, se realizó un curso temporal para los tres opioides con el propósito de identificar los tiempos en los que no se alteraba la viabilidad celular.

Como se observa en la figura 19, las incubaciones prolongadas hasta por 24 h de morfina 1 mM y metadona 0.1 mM no modificaron la viabilidad celular con respecto al vehículo. Sin embargo, el fentanilo 1 mM disminuyó el porcentaje de viabilidad celular al 72.7 % después de 12 h de incubación, y a las 24 h al 51.3 %. Con base en este resultado, se escogieron 8 h como tiempo máximo de exposición a fentanilo.

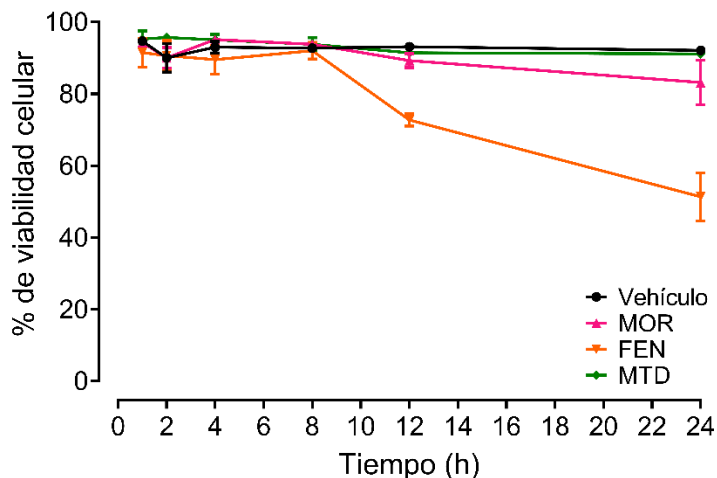


Figura 19. El fentanilo induce la muerte celular en BMMCs a tiempos prolongados de exposición. Curso temporal de los efectos de 1 mM de morfina (MOR), 1 mM de fentanilo (FEN) y 0.1 mM de metadona (MTD) sobre la viabilidad celular. Cada punto representa el promedio \pm EE n=3.

7.1.3 La estimulación prolongada de las BMMCs con los opioides inhibe la secreción de TNF- α mediada por LPS

Después de determinar los tiempos de estimulación que no produjeron muerte celular, se evaluó la secreción de TNF- α inducida por LPS en BMMCs después de estimularlas con 1 mM de morfina, 1 mM de fentanilo o 0.1 mM de metadona durante 1, 2, 4 y 8 h. En todos los casos los opioides inhibieron el efecto del LPS y no se observó tolerancia a tiempos prolongados (Fig. 20). Cabe mencionar que analizamos la incubación prolongada con los opioides solos como control y ninguno de ellos modificó los niveles de TNF- α con respecto al vehículo.

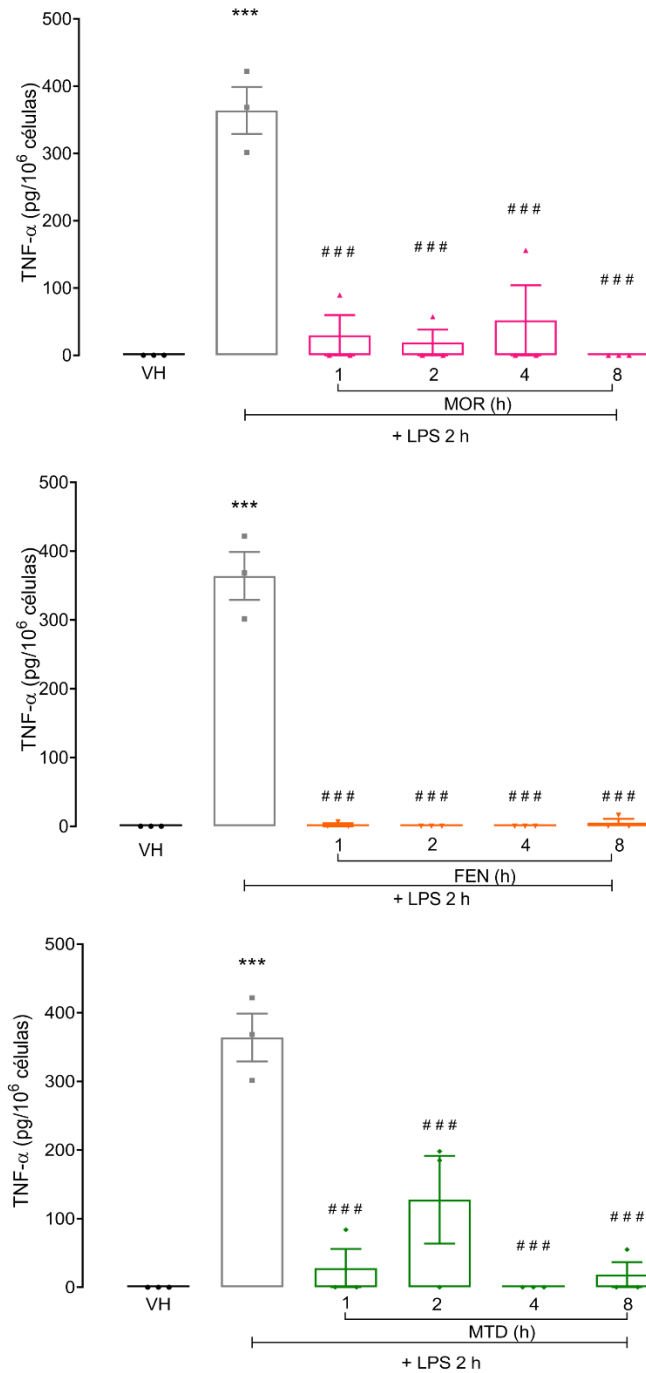


Figura 20. El tratamiento prolongado con los opioides inhibe la señalización del receptor TLR4 en BMMCs. Secreción de TNF- α inducido por el tratamiento prolongado con morfina (MOR), fentanilo (FEN) o metadona (MTD) durante 1, 2, 4 y 8 h. Las barras representan el promedio \pm EEM n=3. ***p<0.001 con respecto al vehículo, ### p<0.001, con respecto al LPS; ANOVA de una vía, seguido de Dunnett.

7.2. Efectos de la morfina, el fentanilo y la metadona sobre moléculas involucradas en la señalización del TLR4 en BMDCs

7.2.1 El fentanilo y la metadona previenen la fosforilación de diferentes cinasas inducida por el LPS

Una vez que se determinó que 1 mM de fentanilo y 0.1 mM de metadona inhibían la secreción de TNF- α mediada por el LPS, se analizó el efecto de estos opioides, por sí solos o en presencia de LPS, sobre la fosforilación de algunas proteínas de la vía de señalización del receptor TLR4. Las proteínas analizadas fueron ERK1/2, AKT, IKK β/α .

La metadona disminuyó significativamente la fosforilación de ERK1/2 y el fentanilo la de AKT mediadas por el LPS. Ambos opioides inhibieron la fosforilación de IKK α/β (Fig. 21).

Con estos experimentos se pudo concluir que el fentanilo y la metadona bloquean la señalización del receptor TLR4 en diferentes puntos de la cascada de señalización, pero convergen en el punto de inhibición de IKK α/β .

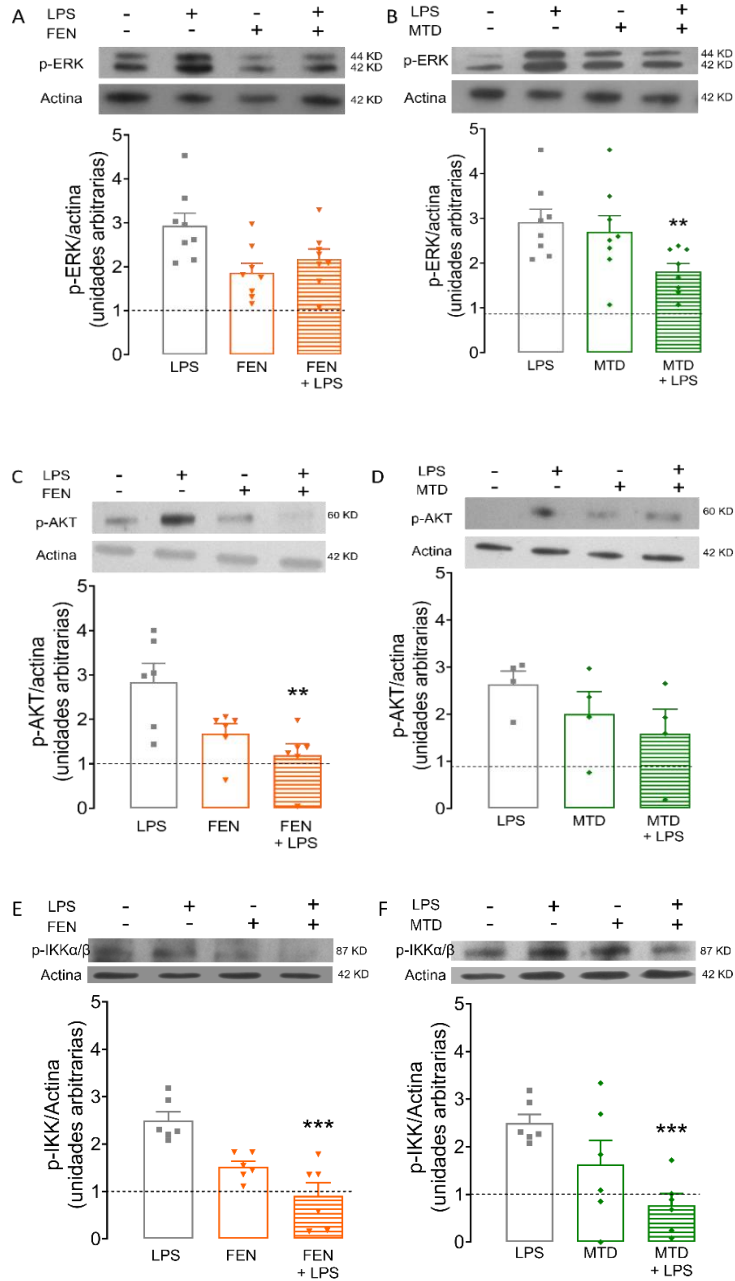


Figura 21. El fentanilo y la metadona inhiben la fosforilación de diferentes cinasas mediada por el LPS. Western blots que muestran la fosforilación de ERK1/2 (páneos A y B) AKT (páneos C y D) e IKKα/β (páneos E y F) producida por 500 ng/mL de LPS, 1 mM de fentanilo (30 min) o 0.1 mM de metadona (1 h), solos o con LPS. Las barras representan el promedio \pm EE n=4-6. Los datos están normalizados con respecto al vehículo (línea punteada). ** p<0.01, ***p<0.001, con respecto al LPS, t de Student.

7.2.2 Los opioides promueven la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6

Después se analizó si los opioides utilizados inducían la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6 en presencia del LPS y se observó que tanto los opioides solos como con LPS indujeron la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6 en magnitudes similares (Fig. 22). Los resultados indican que tanto el LPS, los opioides y los opioides más el LPS conducen a la formación de este complejo.

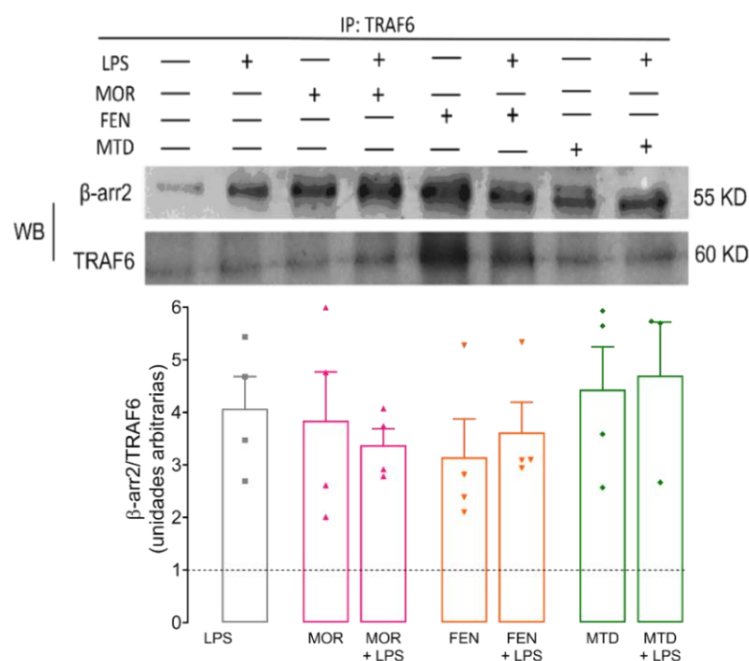


Figura 22. Los opioides aumentan la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6. Coimmunoprecipitación de la β -arr2 y TRAF6 por los tratamientos con LPS, morfina (MOR), fentanilo (FEN) y metadona (MTD) solo o con LPS. Las barras representan el promedio \pm EE n=4. Los valores se normalizaron con respecto al vehículo (línea punteada).

7.2.3 El receptor μ -opioides media los efectos inhibidores de la morfina, el fentanilo y la metadona sobre el TLR4

Para analizar si el efecto inhibitor del fentanilo y la metadona sobre la secreción de TNF- α inducida por el LPS se encontraba mediado por el receptor μ , se utilizaron tres antagonistas opioides. Tanto el antagonista inespecífico, naloxona, como el antagonista selectivo para el receptor δ , naltrindol, y el antagonista selectivo para el receptor μ , CTAP, bloquearon parcial, pero significativamente, el efecto inhibitor de la morfina sobre la secreción de TNF- α . En el caso del fentanilo, el bloqueo fue

mayor con la naloxona que con el CTAP. Por otro lado, la naloxona revirtió parcialmente el efecto inhibitor de la metadona, mientras que el CTAP lo hizo completamente (Fig. 23).

Con este experimento se concluye que la inhibición de la señalización del receptor TLR4 generada por la morfina, el fentanilo y la metadona está mediada por la activación del receptor μ .

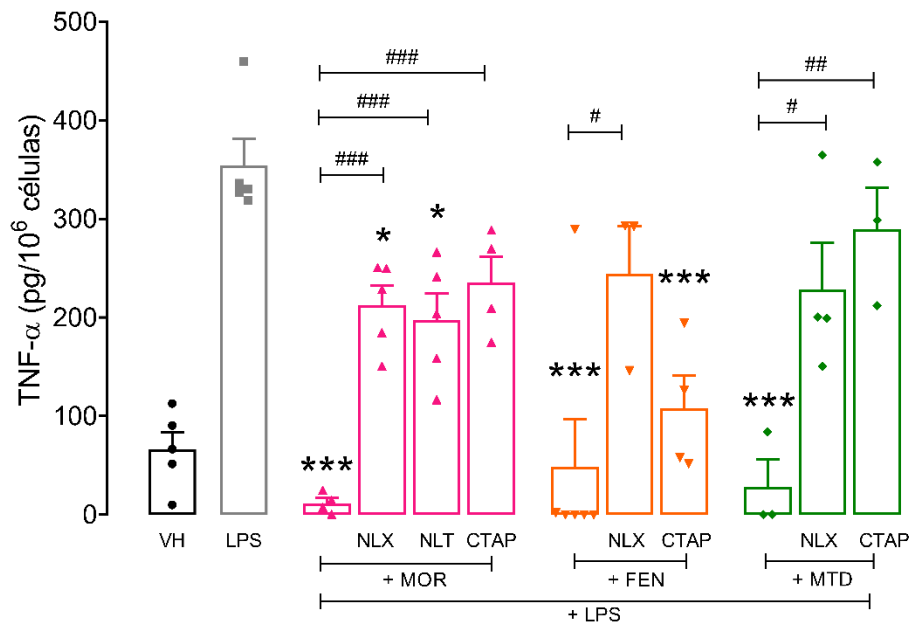


Figura 23: El efecto inhibitor de los opioides sobre el receptor TLR4 está mediado por el receptor μ . Secreción de TNF- α mediada por los antagonistas opioides, naloxona (NLX), naltrindol (NLT) y CTAP, previo a la incubación con morfina (MOR), fentanilo (FEN) y metadona (MTD), antes del reto con LPS. Las barras representan el promedio \pm EE n=3-5. ***p<0.01, con respecto al LPS; ###p<0.001 ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett.

7.3. La metadona modula la secreción de TNF- α de células cebadas presentes en la cavidad peritoneal de ratones

Para determinar si los efectos de la metadona observados *in vitro* se reproducían *in vivo*, se probaron dos dosis de este opioide, 1 mg/kg y 10 mg/kg, administrados en la cavidad peritoneal de ratones por sí solos o combinados con el LPS. Como control fisiológico, se evaluó inicialmente el efecto antinociceptivo de la metadona para

trabajar con una dosis fisiológicamente relevante (Fig. 24, panel A). La dosis de 10 mg/kg fue la que indujo un efecto antinociceptivo.

Después se analizó el efecto individual de la metadona y se observó que por sí misma elevaba la cantidad de TNF- α liberado en la cavidad peritoneal. Sin embargo, cuando se administró la dosis de 10 mg/kg de metadona antes del LPS, se inhibió la liberación de TNF- α .

Al evaluar el efecto de la metadona sobre la secreción de TNF- α en la cavidad peritoneal, se observó que ambas dosis indujeron la secreción de esta citocina al comparar los niveles con los inducidos por el vehículo. Sin embargo, la secreción fue menor a la promovida por la administración de LPS. Con base en estos hallazgos, se seleccionó la dosis de 10 mg/kg para realizar los experimentos subsecuentes.

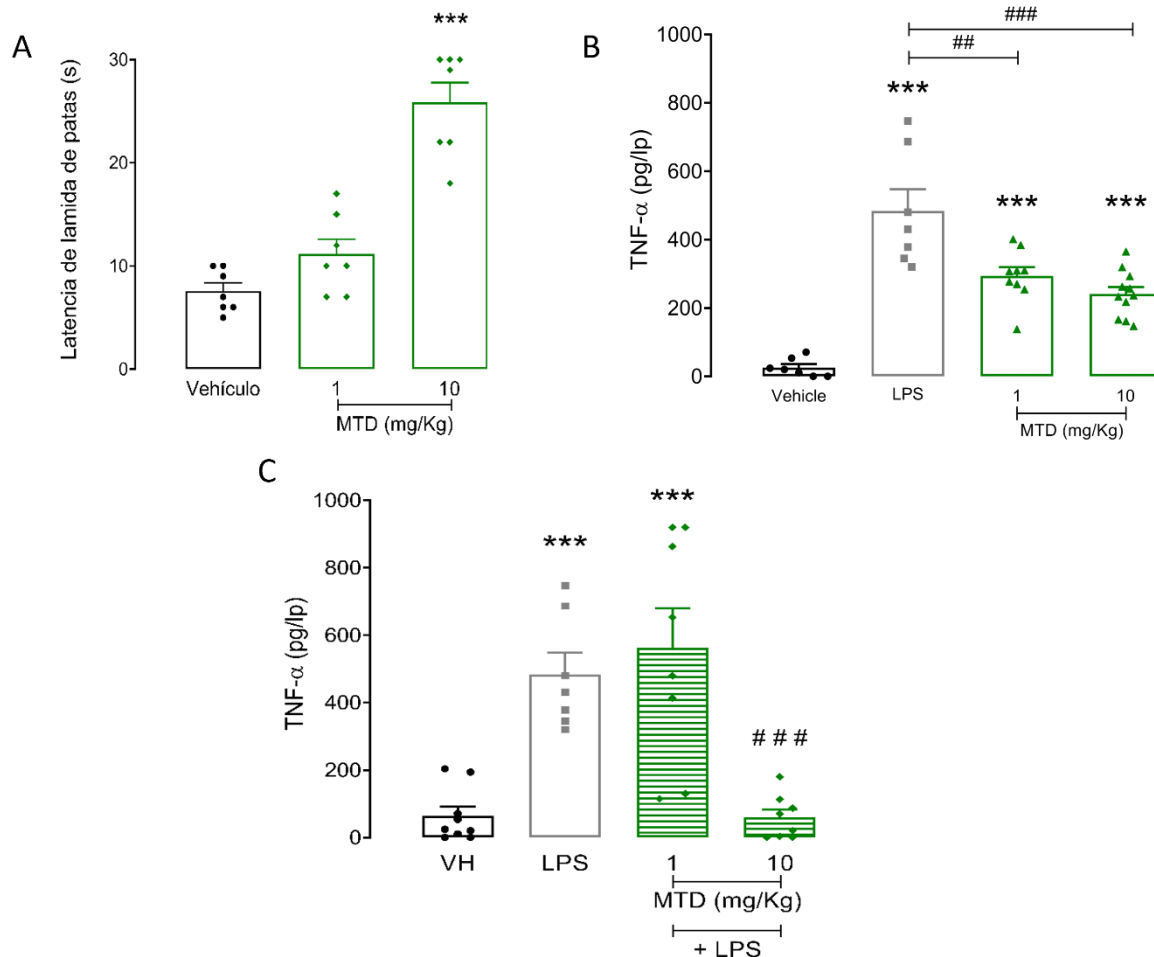


Figura 24. La dosis analgésica de 10 mg/kg de metadona inhibe la secreción de TNF- α mediada por el LPS en las células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones. A) Latencia de lamida de patas en ratones sometidos a la prueba de plancha caliente. B y C) Secreción de TNF- α observada después de la administración de metadona sola o con LPS (1 mg/kg) en la cavidad peritoneal de ratones. Las barras representan el promedio \pm EE n=7-9. ***p<0.01, con respecto al vehículo y ###p<0.001, con respecto al LPS; ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett. Los resultados se expresan en picogramos por lavado peritoneal (pg/lp).

Previamente, en el laboratorio se describió que 6 administraciones repetidas de morfina generaban tolerancia al efecto inhibitor sobre la secreción de TNF- α inducida por el LPS (Molina-Martínez, et al., 2014). Por esta razón, se evaluó el efecto de 6 administraciones de metadona y se comparó con el observado después de una sola administración.

La administración repetida de metadona sola produjo la misma secreción de TNF- α que su administración aguda; es decir, no se generó tolerancia. Por el contrario, la

sexta administración de metadona indujo una menor respuesta al LPS al secretarse aproximadamente el 50% de lo observado con el LPS (Fig. 25). Lo cual indica que la administración repetida de metadona induce tolerancia sobre el efecto inhibitor de la secreción de TNF- α inducida por el LPS.

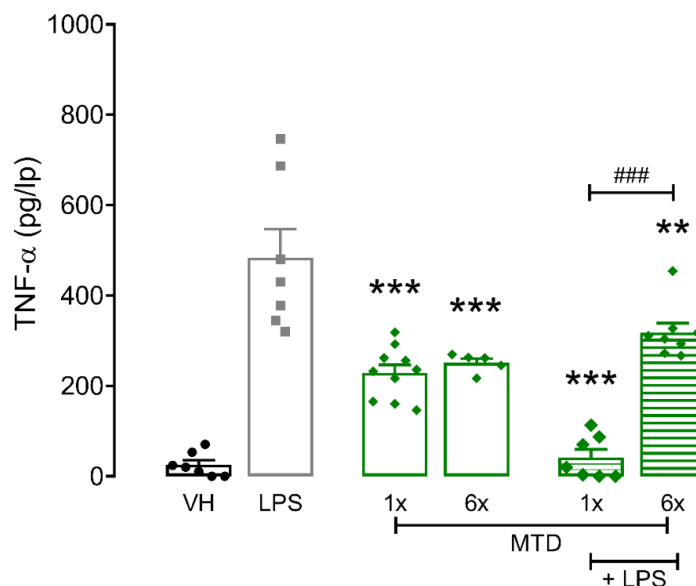


Figura 25. La administración repetida de metadona modifica la secreción de TNF- α por el LPS en la cavidad peritoneal de ratones. Secreción de TNF- α tras la administración de LPS (1 mg/Kg), metadona (MTD; 10 mg/Kg) y la combinación de MTD y LPS, tanto de forma aguda como repetida (6 administraciones). Las barras representan el promedio \pm EEM n= 5-8. **p<0.01; ***p<0.001 con respecto al LPS: ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett. ###p<0.001 con respecto a la administración aguda de metadona más LPS; t de Student. Los resultados se muestran en picogramos por lavado peritoneal (pg/lp).

Para evaluar si el efecto inhibitor de la metadona sobre la secreción de TNF- α inducida por el LPS se debía a su acción sobre las células cebadas, se probaron sus efectos en ratones W-Sh, que son animales carentes de células cebadas, y en ratones W-Sh reconstituidos con BMBCs.

La secreción de TNF- α inducida por el LPS disminuyó aproximadamente a la mitad en los ratones W-Sh en comparación con los WT. La secreción de TNF- α inducida por la metadona, por sí sola, fue similar en los ratones WT y W-Sh. En contraste con los ratones WT, la metadona no inhibió la secreción de TNF- α por el LPS en los

ratones carentes de células cebadas, pero sí en los animales W-Sh reconstituidos con BMMCs (Fig. 26).

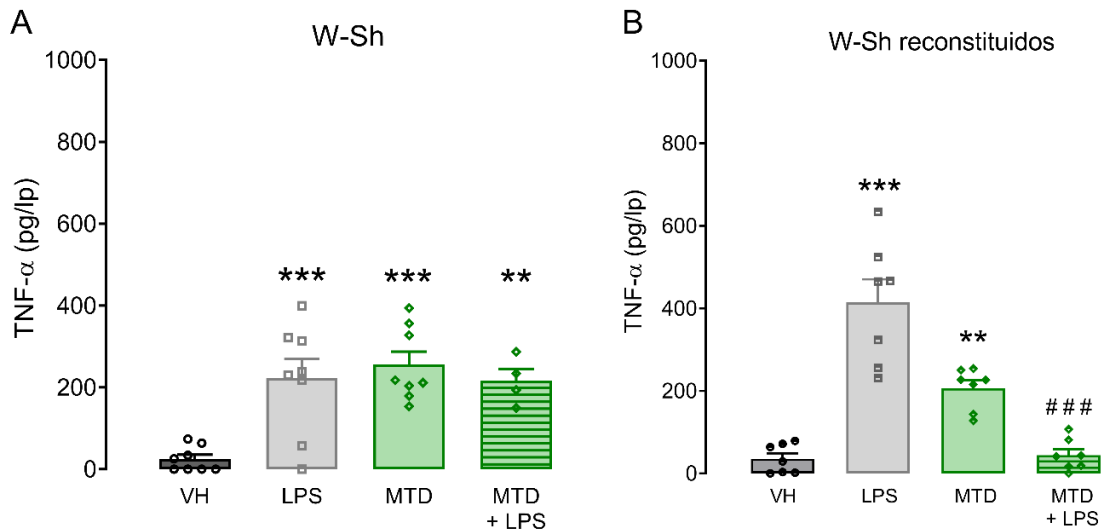


Figura 26. El efecto inhibitor de la metadona sobre la secreción de TNF- α inducida por el LPS está mediado por las células cebadas presentes en la cavidad peritoneal de ratones. Niveles de TNF- α en lavados peritoneales de ratones W-Sh (A) o W-Sh reconstituidos con BMMCs (B) tratados con LPS (1 mg/kg), metadona (MTD; 10 mg/kg) o LPS más metadona a las mismas dosis. Las barras representan el promedio \pm EEM n=4-8. ** p<0.01 y ***p<0.001 con respecto al vehículo, ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett. ### p<0.001 con respecto al LPS, t de Student.

Estos resultados demuestran que: 1) el efecto inhibitor de la metadona sobre la secreción de TNF- α inducida por LPS depende de las células cebadas en la cavidad peritoneal; 2) el efecto inflamatorio de la metadona (secreción de TNF- α) es independiente de las células cebadas de la cavidad peritoneal.

7.4 Evaluación del mecanismo de muerte celular producido por una concentración alta de metadona en BMMCs

7.4.1 La metadona produce muerte rápida de BMMCs de manera dependiente de la concentración

Para establecer el mecanismo por el cual la metadona causa muerte celular, primero se determinaron las condiciones experimentales óptimas para estudiar este fenómeno. Para ello, se evaluó el número de células positivas a TO-PRO3 (indicativo de células muertas) a diferentes tiempos después de la administración de 1 μ M de PMA. Se utilizó este compuesto como control positivo porque se sabe que induce la muerte de BMMCs (Campillo-Navarro et al., 2018; Von Köckritz-Blickwede et al., 2008).

Como se esperaba, se observó muerte celular desde las 2 h de estimulación con PMA, y ésta aumentó con el tiempo (Fig. 27). Basándonos en estos datos, seleccionamos el tiempo de 4 h de estimulación con PMA como control positivo de muerte para los experimentos subsecuentes.

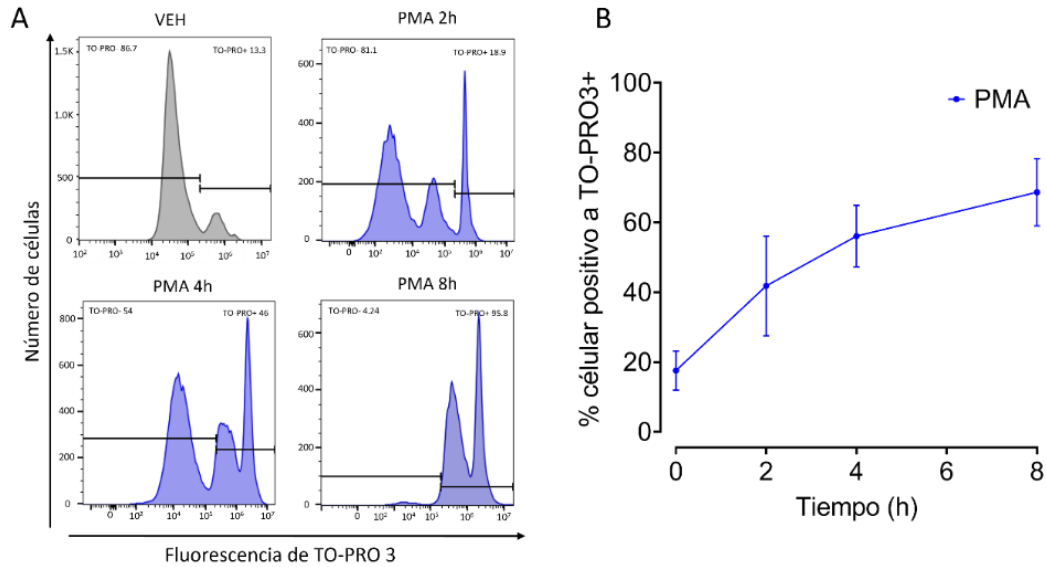


Figura 27. Curso temporal de la inducción de muerte celular por PMA. A) Histogramas representativos de citometría de flujo del curso temporal de PMA. Las BMMCs se estimularon con PMA por 2,4 y 8 h. B) Porcentaje celular positivo a TO-PRO3. N=4 experimentos independientes.

Posteriormente, se realizó una curva concentración-respuesta de la inducción de muerte celular utilizando 0.1, 0.5 y 1 mM de metadona durante 10 min. La dosis más baja no tuvo efecto, pero las dosis de 0.5 y 1 mM produjeron 58% y 80 % de células muertas, respectivamente (Fig. 28).

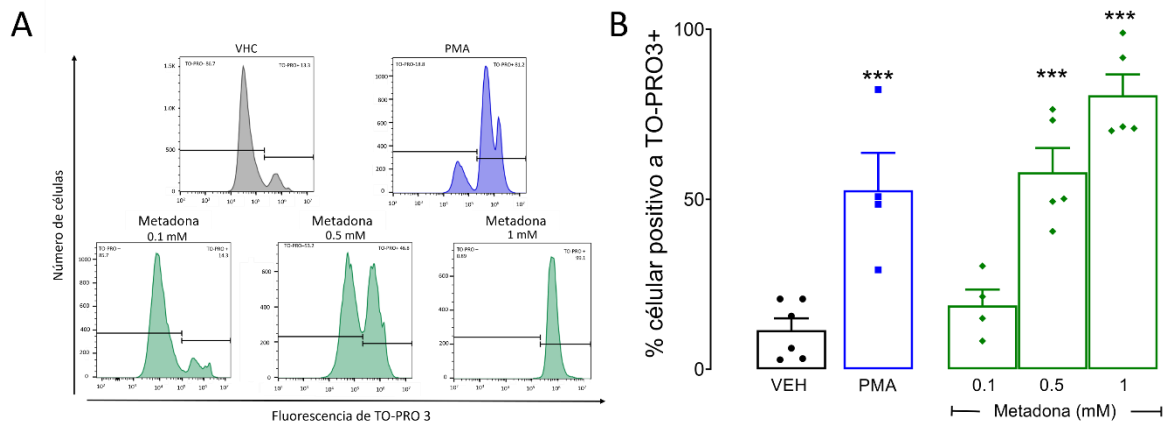


Figura 28. Curva concentración respuesta de muerte celular inducida por la metadona. A) Histogramas representativos de la citometría de flujo. B) Gráfica de la curva concentración-respuesta de la muerte celular inducida por metadona, se muestra el porcentaje de células positivas a TO-PRO3. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett (n=4-6). ***p< 0.001 con respecto al vehículo.

Después se incubaron las BMMCs con 0.5 o 1 mM de metadona durante 30 s, 2.5, o 5 min y se observó que la muerte ocurrió desde los primeros 30 s de estimulación (Fig. 29).

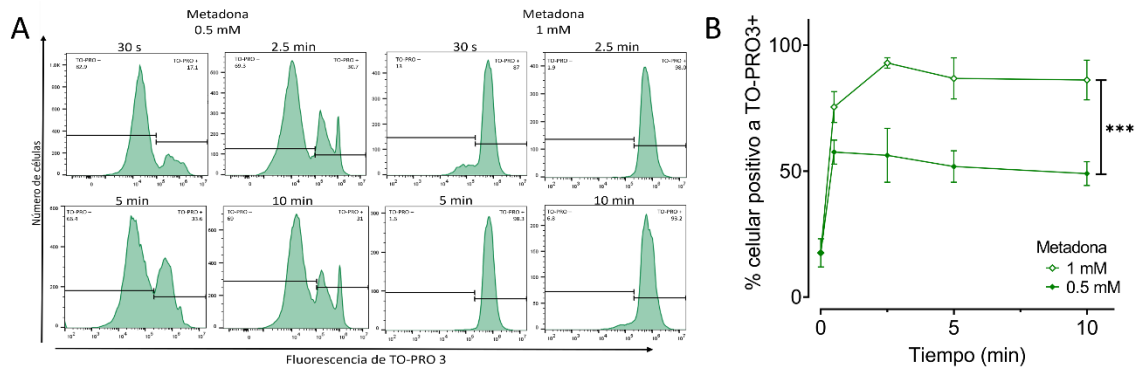


Figura 29. Curso temporal de la muerte celular inducida por la metadona en BMMCs. A) Histogramas representativos de citometría de flujo. B) Gráfica del curso temporal de la muerte celular inducida por dos concentraciones de metadona, evaluada por el porcentaje de células positivas a TO-PRO3. ANOVA de dos vías para muestras repetidas, seguido de Bonferroni (n=5). ***p< 0.001.

7.4.2 La metadona induce la muerte de BMMCs a través de la formación de trampas extracelulares de ADN

Con el fin de identificar el mecanismo intracelular que conduce a la muerte celular mediada por metadona, se analizó la morfología de las células estimuladas durante 10 min con 0.5 y 1 mM de metadona en el microscopio confocal, utilizando DAPI como marcador de ADN. A diferencia de las BMMCs tratadas con vehículo que presentaban el núcleo y la membrana celular definidos e intactos, en las BMMCs tratadas con PMA se observaron cúmulos y algunas hebras de ADN. Las células estimuladas con 0.5 mM de metadona también formaron agregados y algunas secretaron fibras de ADN. Con la concentración más alta (1 mM), las células expulsaron todo el ADN como sucede cuando se forman trampas extracelulares de ADN (Fig. 30).

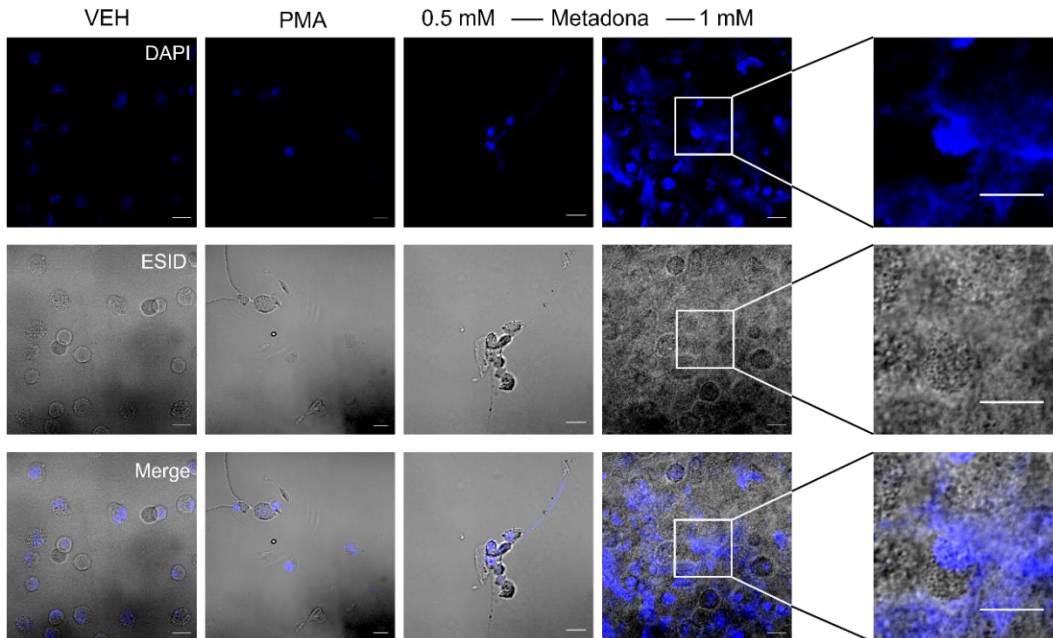


Figura 30. La metadona induce la formación de trampas de ADN en BMMCs: microscopía confocal. Imágenes de microscopía confocal, representativas de las trampas de ADN inducidas por metadona en BMMCs. Todas las imágenes se obtuvieron con el objetivo de 40x. El ADN se marcó con DAPI; para delimitar la membrana se utilizó el detector de luz transmitida (ESID). La barra de calibración blanca corresponde a 10 μ m.

Después se analizó a las BMMCs tratadas con metadona durante 10 min por microscopía de barrido. Las células tratadas con vehículo presentaron estructuras definidas (ondas o pliegues) en la membrana plasmática, lo que corresponde a la morfología característica de las células cebadas (Fig. 31A). La metadona (0.5 mM) indujo la formación de agregados celulares, pérdida de las ondulaciones de la membrana celular, secreción de algunas hebras de ADN (flecha azul) y expulsión de material granular (flecha amarilla) a través de hoyos formados en la membrana celular (flecha verde; Fig. 31C). El PMA produjo efectos similares (Fig. 31B). La concentración de 1 mM de metadona provocó la salida de grandes cantidades de ADN, el cual formó una extensa red acompañada de material granular e histonas (flecha rosa). Las pocas células atrapadas en la red tenían un tamaño reducido y no presentaban ondas membranales (Fig. 31D).

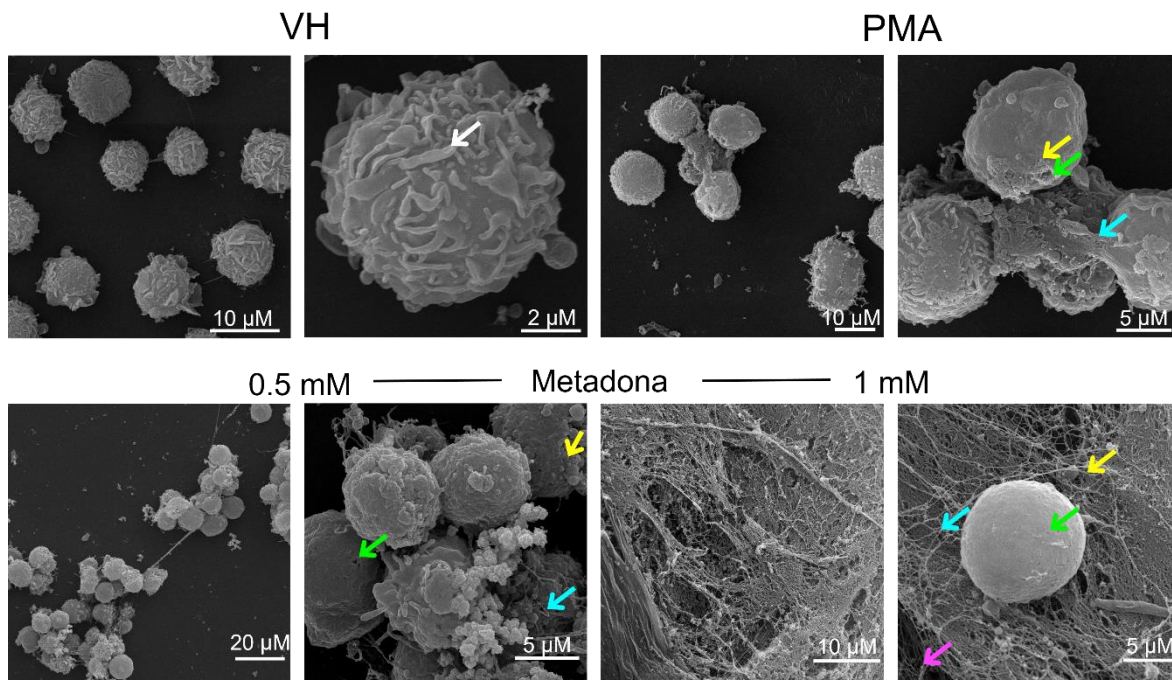


Figura 31. La metadona induce la formación de trampas de ADN en BMMCs: microscopía de barrido. BMMCs tratadas con el vehículo (VH), PMA (1 μ M por 4 h) y 0.5 o 1 mM de metadona durante 10 min. La fecha blanca indica los surcos característicos de membrana celular en BMMCs. La flecha verde los hoyos, la flecha amarilla los cuerpos circulares saliendo de las células muertas, la flecha azul los hilos de ADN y la flecha rosa las histonas. Imágenes representativas de uno de tres experimentos.

Dado que las trampas extracelulares de ADN descritas en células cebadas están acompañadas de por β -hexosaminidasa y triptasa (Campillo-Navarro et al., 2018), se usaron anticuerpos contra esas proteínas en BMMCs tratadas con 0.5 y 1 mM de metadona durante 2.5 ó 5 min y se observaron al microscopio confocal.

La triptasa se encontró dentro de las células y la histona 3 citrulinada colocalizando con el núcleo, en las BMMCs tratadas con el vehículo. El PMA aumentó la fluorescencia de la histona 3 citrulinada y se observó una hebra de ADN (Fig. 32B). La metadona indujo agregados celulares y secreción del contenido genético acompañado de la triptasa y la histona 3 citrulinada, de manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. De hecho, la concentración de 1 mM (Fig. 32F) indujo la ruptura de todas las células a los 5 min y se formó una masa con las proteínas analizadas.

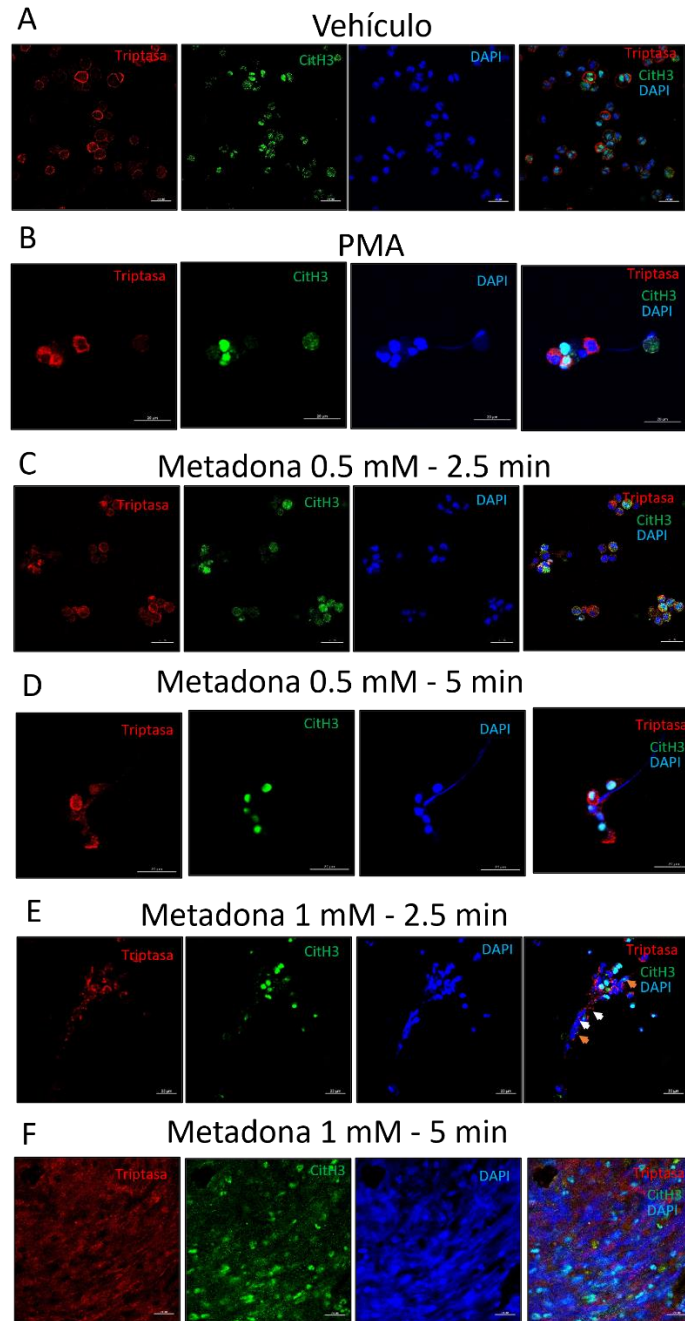


Figura 32. Las trampas de ADN inducidas por la metadona contienen a la histona 3 citrulinada y a la triptasa. Imágenes representativas de microscopía confocal donde se muestra a la triptasa en rojo, a la histona 3 citrulinada (CitH3) en verde y al ADN en azul. A) Estimulación con vehículo. B) Estimulación con PMA. C) Tratamiento de 0.5 mM de metadona por 2.5 min. D) Tratamiento de 0.5 mM de metadona por 5 min. E) Tratamiento de 1 mM de metadona por 2.5 min. F) Tratamiento de 1 mM de metadona por 5 min. La flecha blanca indica la triptasa y la naranja la histona 3 citrulinada (CitH3). Las imágenes son representativas de tres experimentos hechos en cultivos independientes. La barra de escala es de 20 μm ; las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 40x.

Los resultados de microscopía permitieron escoger la concentración de 0.5 mM de metadona y el tiempo de exposición de 5 min para los experimentos siguientes, porque con estas condiciones se induce la muerte en aproximadamente el 50% de BMMCs.

7.4.3 La producción de especies reactivas de oxígeno y el aumento de Ca^{2+} intracelular son críticos en la muerte celular inducida por la metadona en BMMCs

Para determinar los procesos involucrados en la muerte de las BMMCs por la formación de trampas extracelulares de ADN, se determinó que, tanto el PMA como la metadona incrementaron la cantidad de especies reactivas de oxígeno con respecto al vehículo, tanto en el pellet como en el sobrenadante (Fig. 33).

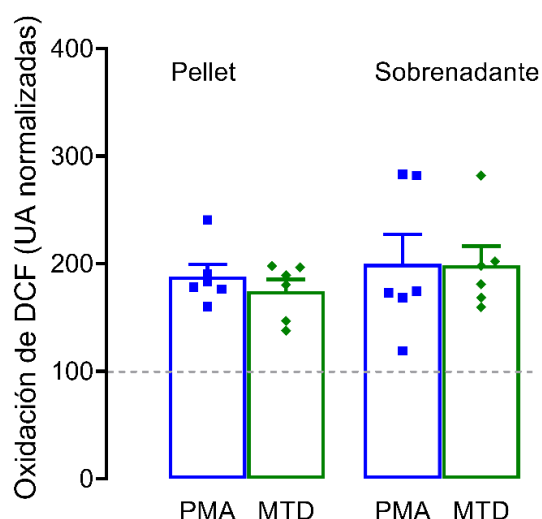


Figura 33. La metadona induce la producción de especies reactivas de oxígeno en BMMCs. Un millón de células fueron cargadas con DCF-DA por 30 min y tratadas con PMA (1 μ M por 4 h) o con 0.5 mM de metadona por 5 min. La intensidad de fluorescencia del pellet y sobrenadante se utilizaron para medir la producción de especies reactivas de oxígeno intracelular y extracelular, respectivamente. Los valores fueron normalizados con respecto al vehículo (línea punteada). ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (n=6).

Por otro lado, la metadona aumentó la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) al doble con respecto al vehículo, mientras que del PMA no tuvo efecto.

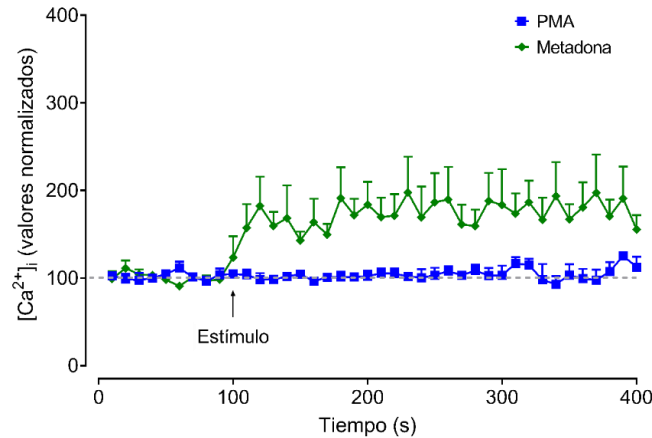


Figura 34. La metadona aumenta la concentración de calcio intracelular en BMMCs. Movilización de calcio intracelular en BMMCs tratadas con 0.5 mM de metadona o PMA. La fluorescencia basal se muestra como una línea gris punteada. N= 3-4.

En el siguiente experimento se administraron un antioxidante (Trolox 10 mM) o un quelante de calcio (BAPTA 50 μ M), 15 min antes de la estimulación con metadona y ambos tratamientos redujeron la muerte celular, corroborando así que la producción de especies reactivas de oxígeno y el aumento de calcio intracelular juegan un papel importante en la muerte celular causada por la metadona.

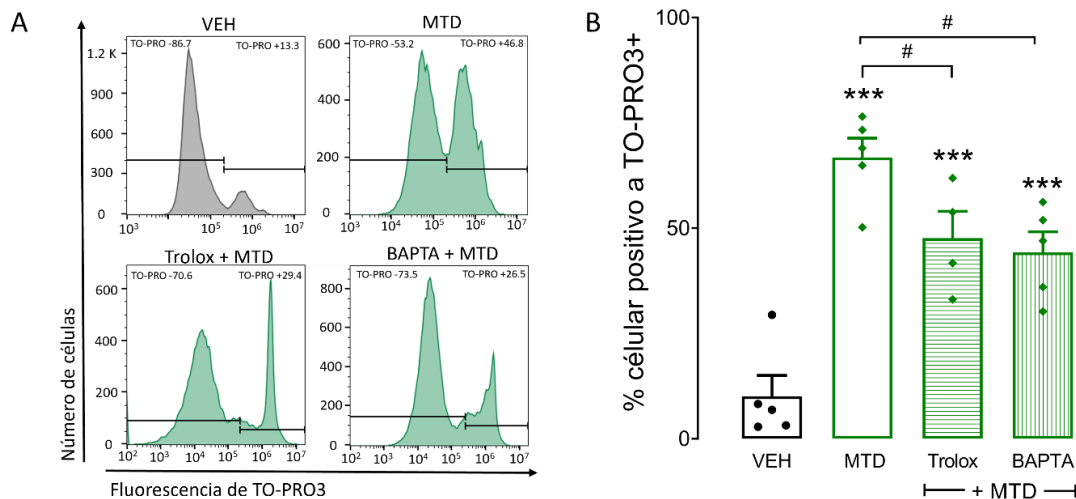


Figura 35. La muerte celular inducida por la metadona depende de la producción de especies reactivas de oxígeno y del aumento de calcio intracelular. A) Histogramas representativos de BMMCs incubadas con Trolox (10 mM) o BAPTA (50 μ M) 15 min antes de la administración de 0.5 mM de metadona durante 5 min. B) Porcentaje de células positivas a TO-PRO3. (N=4-5). ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett (n=4-6). ***p< 0.001, con respecto al vehículo y # p<0.05, con respecto a la metadona.

7.4.4 Los receptores μ y TLR4 participan en la muerte celular inducida por metadona en BMMCs

Lo siguiente que se investigó fue el papel de los receptores μ y TLR4 en la muerte celular inducida por metadona. Para este fin, las BMMCs se preincubaron con 10 μ M de naloxona o 1 μ M de β -FNA, antagonista irreversible del receptor μ , 15 min antes del reto con metadona. Como se observa en la figura 36A-B, tanto la naloxona como el β -FNA disminuyeron el porcentaje de muerte celular a menos de la mitad.

Para analizar el papel del receptor TLR4 se utilizaron BMMCs de ratones carentes del receptor TLR4 (BMMCs LPS/del). En este tipo celular, la metadona produjo la muerte de aproximadamente la cuarta parte de las células tratadas con metadona (Fig. 36C). Es decir, 40% menos que lo observado en las BMMCs WT. Estos resultados demuestran que tanto el receptor μ como el TLR4 participan en la muerte celular inducida por metadona.

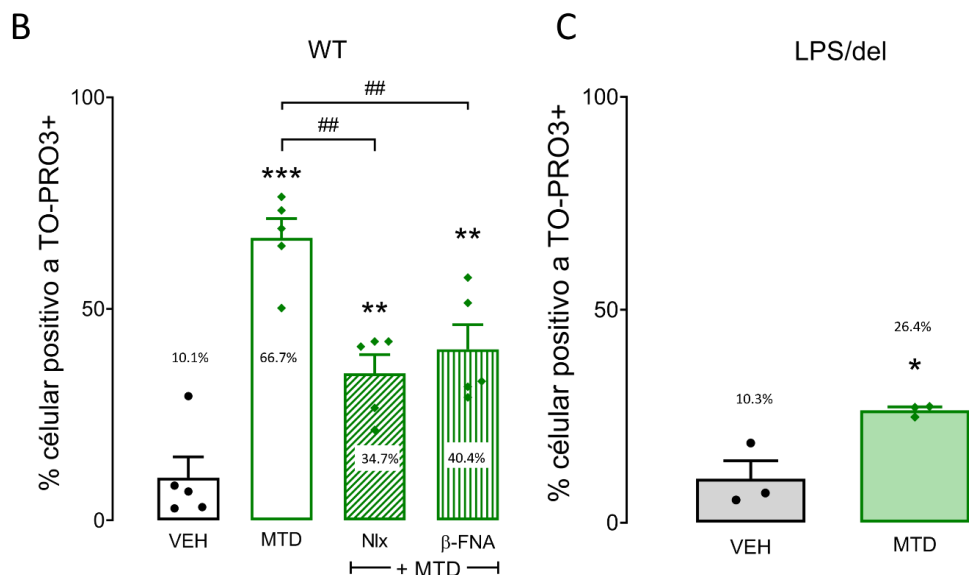
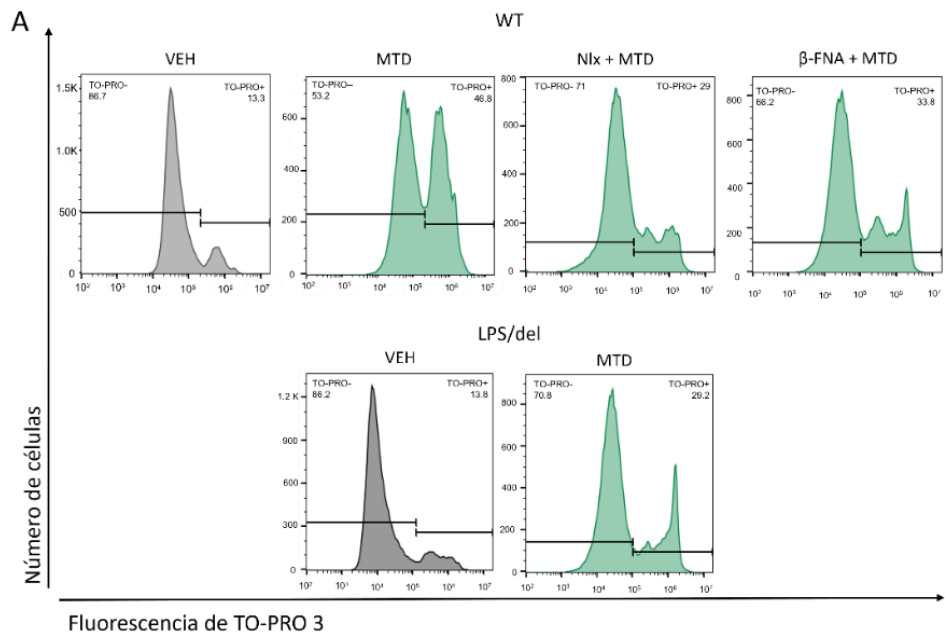


Figura 36. La muerte celular inducida por la metadona en BMMCs depende de los receptores μ y TLR4. A) Histogramas representativos de las BMMCs pretratadas con naloxona (NLX; 10 μ M) o β -FNA (1 μ M) antes de la estimulación con metadona (MTD). B) Gráfica de barras que representa el porcentaje de células WT positivas a TO-PRO3. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett's (n=5). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al vehículo; ## $p < 0.01$ respecto de la metadona. C) Gráfica de barras que representa el porcentaje de células LPS/del positivas a TO-PRO3. t de Student * $p < 0.05$ con respecto al vehículo (VEH).

7.4.5 El receptor μ requiere del receptor TLR4 para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno mediada por metadona

Para determinar la participación del receptor μ o TLR4 en la producción de las especies reactivas de oxígeno mediada por la metadona, las BMMCs se pretrataron durante 15 min con 10 μ M de naloxona o 1 μ M de β -FNA antes del reto con metadona. Ambos antagonistas disminuyeron los niveles de especies reactivas de oxígeno inducidas por la metadona, indicando la participación del receptor μ (Fig. 37A). Posteriormente se evaluó la participación del TLR4 en la producción de especies reactivas de oxígeno causada por metadona. Para ello, se utilizaron las BMMCs derivadas de ratones LPS/del. Como se observa en la figura 37, panel B, en este caso la metadona no produjo especies reactivas de oxígeno. Estos resultados demuestran que el receptor μ es necesario para producir especies reactivas de oxígeno, pero requiere de la presencia del TLR4 para mediar este efecto.

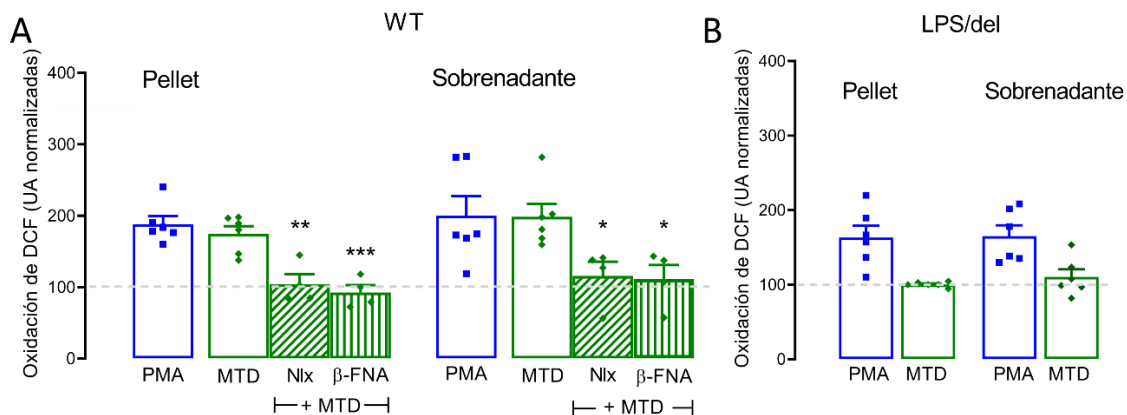


Figura 37. La producción de especies reactivas de oxígeno inducida por la metadona es dependiente de los receptores μ y TLR4. A) Producción de ROS en BMMCs WT tratadas con PMA, metadona (MTD), naloxona (NLX; 10 μ M) o β -FNA (1 μ M) antes del tratamiento con metadona. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (n=4-7). *p < 0.05, ** p < 0.01 y ***p < 0.001 con respecto a la metadona sola. B) Mismo tratamiento que en A, pero en BMMCs LPS/del. N= 6. Todos los datos obtenidos se normalizaron con respecto a las BMMCs tratadas con vehículo (línea punteada).

7.4.6 La activación del receptor μ induce la movilización de calcio en BMMCs

Para saber si el receptor μ contribuía al aumento de calcio intracelular mediado por metadona, las BMMCs de animales WT y LPS/del se pretrataron durante 15 min con β -FNA con lo que se evitó el aumento de calcio intracelular (Fig. 38). Estos resultados indican que el receptor μ -opioide, pero no el TLR4, es el responsable del incremento del calcio intracelular inducido por la metadona.

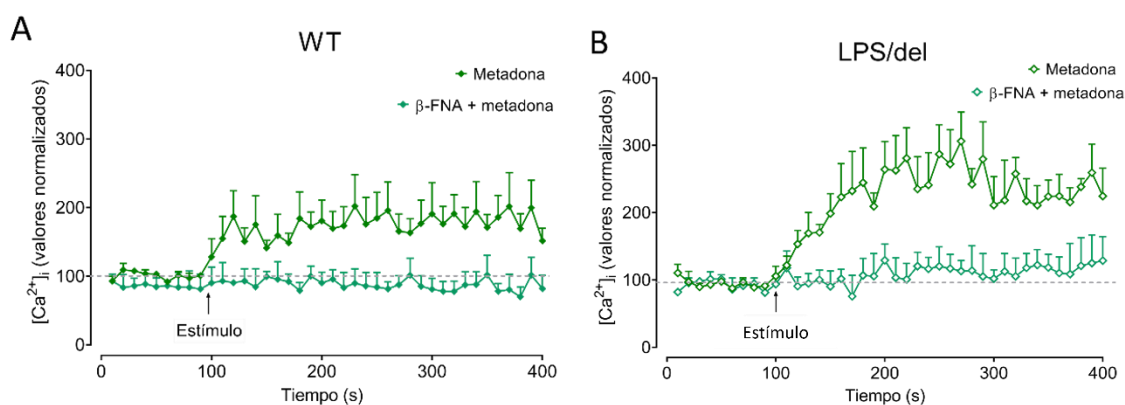


Figura 38. El incremento de calcio intracelular producido por la metadona depende del receptor μ . A) Trazo de la movilización de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) inducido en BMMCs WT por la metadona o el β -FNA más metadona. B) Trazo de calcio de cultivos deficientes del receptor TLR4. N= 3-6.

7.5 Los receptores μ y TLR4 comparten la misma localización intracelular en BMMCs

Debido a que la metadona aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y este efecto requiere de la presencia del receptor μ y TLR4, se evaluó la posible interacción entre estos dos receptores mediante microscopía confocal, utilizando una concentración de metadona que no induce muerte celular (0.1 mM durante 30 min).

Los receptores se encontraron en los mismos compartimentos intracelulares, en las células tratadas con el vehículo (Fig. 39A) y su colocalización aumentó con metadona.

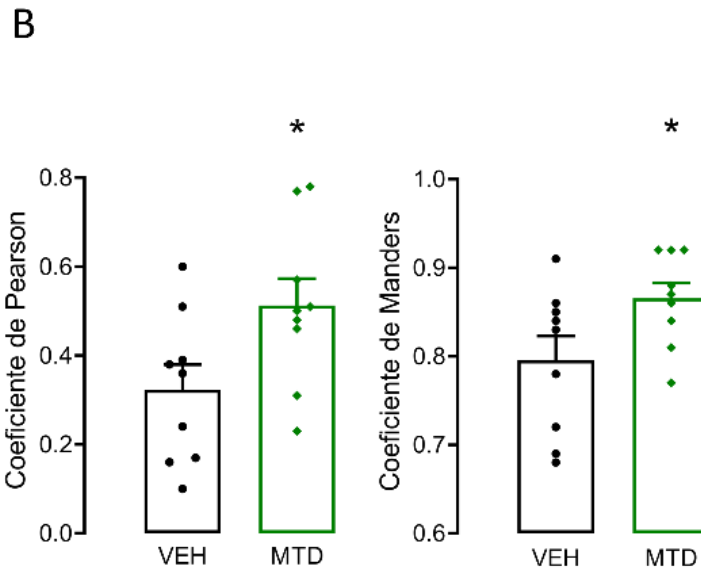
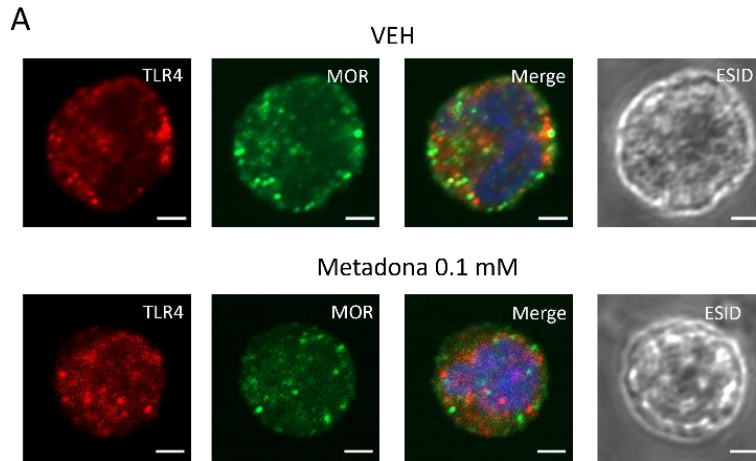


Figura 39. Los receptores μ y TLR4 ocupan el mismo espacio intracelular. A) imágenes representativas de la microscopía confocal de las BMMCs tratadas con vehículo (VEH) o 0.1 mM de metadona por 10 min. La barra de calibración corresponde a 2 μ m. Las imágenes se tomaron en el objetivo de 63x. B) Análisis de colocalización entre los receptores a través de los coeficientes de Pearson y Manders. t de Student * $p < 0.05$, con respecto al vehículo. N= 9 células de 3 experimentos independientes.

En conclusión, la metadona induce muerte celular por formación de trampas extracelulares de ADN en BMMCs de manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Este proceso depende de la participación conjunta de los receptores μ y TLR4, y se produce por un aumento de especies reactivas de oxígeno y de calcio intracelular.

8. Discusión

Los opioides tienen diferentes efectos sobre el sistema inmune (Batista et al., 2012; Franchi et al., 2019; González-Espinosa et al., 2022; Hutchinson et al., 2011). Pueden inhibir la actividad y maduración de muchas células, modular la secreción de citocinas inducida o no por patógenos e inducir muerte celular (Carranza-Aguilar et al., 2020; Ma et al., 2017; Rojavin et al., 1993). En este trabajo se observó que la morfina, el fentanilo y la metadona tienen efectos diferentes sobre las células cebadas. Estos efectos dependen de: 1) la concentración, 2) el tiempo de estimulación y 3) el receptor que activan. El opioide que, a dosis altas, presentó mayor diferencia de efectos fue la metadona, que indujo la muerte de BMMCs, además de inhibir de la secreción de TNF- α mediada por el LPS, efecto que comparte con morfina y fentanilo. En la tabla 5 se desglosan los efectos principales de los opioides sobre las células cebadas. En azul se muestran los resultados de esta tesis.

Tabla 5. Efectos de los diferentes tratamientos con morfina, fentanilo y metadona sobre las células cebadas

| Efecto | Morfina | Fentanilo | Metadona |
|--|---|--|--|
| <i>In vivo - Agudo</i> | | | |
| Secreción de TNF- α en la cavidad peritoneal de ratones | Sin efecto | Sin efecto | Si 1 mg/kg y 10 mg/kg |
| Secreción de TNF- α por LPS en la cavidad peritoneal de ratones | Inhibición 10 mg/kg | Inhibición 0.1 mg/kg | Inhibición 10 mg/kg |
| <i>In vivo - Estimulaciones repetidas</i> | | | |
| Secreción de TNF- α | No | No | Si |
| Secreción de TNF- α por LPS | Tolerancia – Secreción de TNF- α | Aumento de la secreción de TNF- α | Inhibición |
| <i>In vitro - Agudo</i> | | | |
| Secreción de TNF- α | Sin efecto | Sin efecto | Sin efecto |
| Secreción de TNF- α por LPS | Inhibición 1 mM – 30 min | Inhibición 1 mM – 30 min | Inhibición 0.1 mM – 1 h |
| Inhibición de TNF- α por LPS depende de los receptores opioides | Receptor μ y δ | Receptor μ | Receptor μ |
| Fosforilación de MAPKs y otras cinasas | ERK1/2, JNK y AKT | AKT | ERK1/2 y AKT |
| Inhibición de la fosforilación de MAPKs y otras cinasas por el LPS | ERK1/2 e IKK α / β | AKT e IKK α / β | ERK1/2 e IKK α / β |
| Formación del complejo β -arrestina2/TRAF6 | Si | Si | Si |
| Muerte celular | Sin efecto | Sin efecto | Si 0.5 mM y 1 mM Desdés los 30 s |
| Receptor del que depende la muerte celular | NA | NA | Receptor μ y TLR4 |
| Tipo de muerte celular | NA | NA | ETosis Dependiente de ROS y calcio |
| <i>In vitro - prolongado</i> | | | |
| Muerte celular | Sin efecto | Si 1 mM - 12 h | Sin efecto |
| Receptor del que depende la muerte celular | NA | ND | NA |
| Tipo de muerte celular | NA | ND | NA |
| Secreción de TNF- α | Sin efecto | Sin efecto | Sin efecto |
| Secreción de TNF- α por LPS | Inhibición | Inhibición | Inhibición |

NA: no aplica; ND: no determinado; ROS: especies reactivas de oxígeno.

8.2 La morfina, el fentanilo y la metadona inhiben de forma diferencial la secreción de TNF- α inducida por el LPS a través de la activación del receptor μ -opioide en células cebadas

Diferentes estudios han demostrado que los opioides inhiben la secreción y la producción de citocinas, la fagocitosis y el cambio de fenotipo en células del sistema inmune (Li et al., 2002; Ma et al., 2017; Maher et al., 2019; Martin et al., 2010; McLaughlin et al., 2015). En células cebadas, en particular, se ha observado que la morfina inhibe la secreción de TNF- α inducida por el LPS (Madera-Salcedo et al., 2011, 2013; Molina-Martínez et al., 2014). En este trabajo se demostró que el fentanilo y la metadona tienen el mismo efecto sobre la señalización del receptor TLR4 que la morfina (Fig. 40), pero difieren en el tiempo de estimulación y la concentración a la cual se observa este efecto. Los tres opioides impiden la señalización de TRAF6 mediante la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6 e inhiben la fosforilación de IKK α/β , lo cual bloquea la activación de sintaxina 4 y SNAP23, impidiendo así la secreción de TNF- α . Por otro lado, la morfina y la metadona impiden la fosforilación de ERK1/2 mediada por el LPS, mientras que el fentanilo impide la de AKT. Aún queda por estudiar el impacto que estos efectos pudieran tener sobre la síntesis de proteínas.

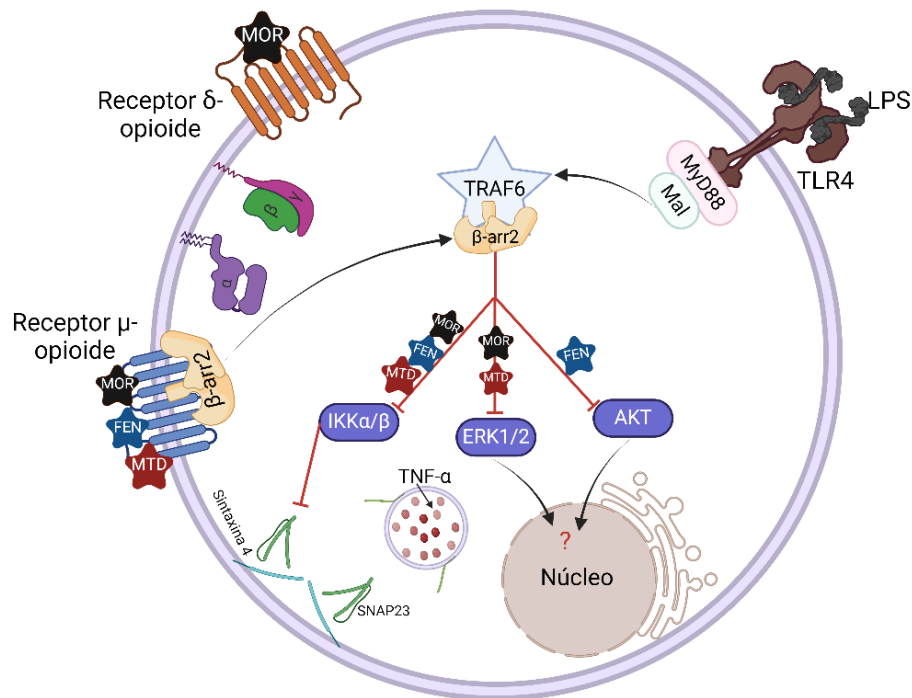


Figura 40. La morfina, el fentanilo y la metadona inhiben la señalización del receptor TLR4 activado por el LPS. La estimulación, en BMMCs, con 1 mM de morfina (MOR) o fentanilo (FEN) durante 30 min y de 0.1 mM de metadona (MTD) durante 1 h inducen la formación del complejo β -arrestina2/TRAF6, lo que conduce a una inhibición de la señalización del receptor TLR4 activado por el LPS. Esta inhibición impide la activación de IKK α / β lo que resulta en la falta de activación de SNAP-23 y sintaxina 4 y, por ende, en la inhibición de la secreción de TNF- α . Además, tanto la morfina como la metadona impiden la fosforilación de ERK1/2, mientras que el fentanilo impide la fosforilación de AKT.

Se observó que el efecto inhibitorio del fentanilo, en BMMCs, se manifestó a la misma concentración y tiempo de estimulación que la morfina. Este resultado fue sorprendente, ya que el fentanilo es 100 veces más potente para inducir analgesia y presenta mayor afinidad por el receptor μ -opioide que la morfina (Birchall y Gillet, 2011; Ellis et al., 2018; Volpe et al., 2011). Una posible explicación de este fenómeno es que en las BMMCs los receptores opioides se encuentran internalizados (Martínez-Cuevas et al., 2019), lo que requiere de mayor concentración del ligando para alcanzar el sitio donde se encuentra el receptor. Además, se ha observado que en algunas células en cultivo se necesita una mayor cantidad del opioide para observar un efecto en vías de señalización (Sogos et al., 2021; Zhuang et al., 2022). Por otro lado, las afinidades de los ligandos opioides se

han determinado en cultivos neuronales, células de neuroblastoma y cultivos de neuronas humanas, pero no en células del sistema inmune (Ellis et al., 2018; Sogos et al., 2021; Zhuang et al., 2022). Es posible que haya un cambio en sus afinidades debido al movimiento intracelular que experimentan las células del sistema inmune.

La secreción de TNF- α en células cebadas requiere de la fosforilación de IKK α/β . Una vez que IKK α/β está fosforilada, se une a SNAP-23 para activarla. Cuando SNAP-23 está activa se une a las VAMPs que se encuentran en las vesículas que contienen TNF- α (Madera-Salcedo et al., 2013; Suzuki y Verma, 2008). Este trabajo demostró que la morfina (Madera-Salcedo et al., 2013) y la metadona inhiben la fosforilación de ERK1/2 mediada por el LPS, mientras que el fentanilo inhibe la fosforilación de AKT, pero los tres opioides convergen en la inhibición de la cinasa IKK α/β y con ello impiden la secreción de TNF- α . También, se sabe que el receptor μ media el arresto de TRAF6 mediante la β -arrestina2 y eso impide que se active IKK α/β (Madera-Salcedo et al., 2013; Wang et al., 2006). Nuestro trabajo muestra que, al igual que la morfina, el fentanilo y la metadona inducen el arresto de TRAF6 y que este efecto está mediado por el receptor μ -opioide.

Las exposiciones prolongadas o repetidas a opioides generan tolerancia (Dang y Christie, 2011; Williams et al., 2013). En este trabajo se diseñó un protocolo de exposición prolongada a opioides en BMMCs para tratar de dilucidar lo que ocurre en estas condiciones con la inhibición de la secreción de TNF- α inducida por LPS. Se ha reportado que el LPS induce tolerancia endotóxica, en BMMCs, sobre la secreción de TNF- α después de 3 h de estimulación y que este efecto está mediado por la síntesis de reguladores negativos como la cinasa M inactiva asociada a IL-1R (IRAK-M) y el fosfatidilinositol fosfatasa SHIP1 (Espinosa-Riquer et al., 2019; Kobayashi et al., 2002; Sly et al., 2004). Con los opioides se observó que desde la primera hora de estimulación y hasta 8 h después, no hay secreción de TNF- α en respuesta al LPS; es decir, que no se genera tolerancia a este efecto. Una posible explicación sería que en BMMCs se requieran más de 8 h para que el receptor μ se desensibilice. Esto concuerda con el hecho de que después de la unión del receptor μ a la β -arrestina2 éstos se degradan y se requiere de la síntesis de nuevos

receptores, lo cual lleva tiempo (Dang y Christie, 2011; Williams et al., 2013). Otra posible explicación sería que los opioides indujeran la síntesis de IRAK-M y SHIP1, moléculas que inhiben la señalización del receptor TLR4. La síntesis de estas dos se produce también a través de la activación de otro GPCR, el receptor cannabinoide CB2, cuya activación también inhibe la secreción de TNF- α inducida por el LPS en BMMCs (Espinosa-Riquer et al., 2019). Sería interesante dilucidar si los receptores μ y CB2 comparten este mecanismo de acción.

8.2 Modulación de la secreción de TNF- α por la metadona en la cavidad peritoneal de ratones

Previamente en el laboratorio se observó que cuando se administra a ratones 1 mg/kg de fentanilo o 10 mg/kg de morfina por vía intraperitoneal, seguido de un reto con LPS, no hay secreción de TNF- α y que este efecto depende de las células cebadas (Madera-Salcedo et al., 2011; Molina-Martínez et al., 2014). Nuestro trabajo demostró que la dosis de 10 mg/kg de metadona inhibe la secreción de TNF- α producida por LPS en células cebadas de la cavidad peritoneal de ratones. Sin embargo, a diferencia de la morfina y el fentanilo, la metadona induce por sí misma la secreción de TNF- α a partir de una concentración de 1 mg/kg. Esto concuerda con el hecho de que el consumo prolongado de metadona en pacientes induce niveles elevados de citocinas proinflamatorias como TNF- α y IL-1 β en suero (Chan et al., 2015; Wang T et al., 2018). No es la primera vez que se reporta que la metadona induce el aumento de TNF- α por administraciones repetidas en roedores. En ratas, se reportó que 5 administraciones de una dosis de 5 mg/kg de metadona aumentan la expresión de TNF- α en cerebelo. De manera interesante, esta citocina se ha asociado a la apoptosis generada por la metadona (Zamani et al., 2023). Lo anterior está relacionado con el hecho de que la metadona induce muerte celular en células del sistema inmune, un fenómeno inflamatorio. Sin embargo, falta averiguar qué células del sistema inmune participan en la secreción de TNF- α mediada por la metadona o si la metadona está induciendo la muerte en células de la cavidad peritoneal y con ello induciendo un efecto proinflamatorio.

8.3 La metadona induce la muerte celular mediante la formación de trampas extracelulares de ADN a través de la coactivación de los receptores μ y TLR4

Diferentes estudios han demostrado que los opioides inducen varios tipos de muerte celular (Carranza-Aguilar et al., 2020; Hu et al., 2002; Perez-Alvarez et al., 2011). Por ejemplo, la morfina, el agonista opioide prototípico, induce apoptosis en cultivos celulares de neuronas y microglía (Hu et al., 2002), en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) (Lin et al., 2021), en células endoteliales humanas (Hsiao et al., 2009), y en regiones cerebrales de ratas (Bajic et al., 2013) a través de la activación del receptor μ . Por otro lado, la metadona, un opioide con alta afinidad por el receptor μ y que comparte características con la morfina, tiene efectos tóxicos que se han demostrado en células leucémicas y en líneas celulares cancerosas (Friesen et al., 2008, 2011, 2013). Sin embargo, la muerte de BMMCs no se había descrito para ningún opioide.

En este trabajo se demostró que la estimulación con 0.5 y 1 mM de metadona induce la muerte celular de BMMCs mediante la activación de los receptores μ y TLR4 (Fig. 41). Este fenómeno está mediado por la producción de especies reactivas de oxígeno resultante de la activación de ambos receptores y por el aumento de calcio intracelular que depende del receptor μ . Ambos efectos convergen en la activación de PAD4, lo cual conduce a la citrulinación de histonas y a la descondensación del ADN, que lleva a la formación de trampas extracelulares de ADN y, finalmente a la muerte celular. Además, se demostró que los receptores μ y TLR4 comparten el mismo espacio intracelular.

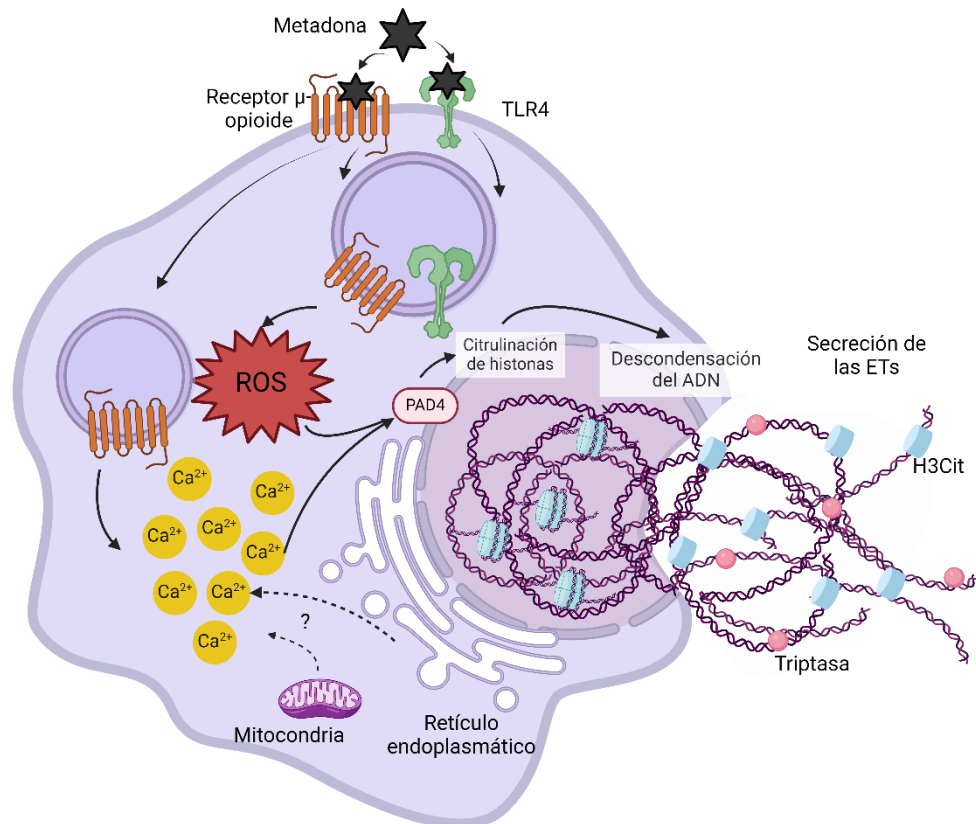


Figura 41. La metadona induce la formación de trampas extracelulares de ADN en células cebadas mediante la activación de los receptores μ y TLR4. La metadona induce la formación de trampas extracelulares de ADN en BMMCs a través de un mecanismo que depende de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y movilización de calcio intracelular. La generación de especies reactivas de oxígeno involucra la activación del receptor μ y la presencia del receptor TLR4, probablemente ocurra una interacción entre ellos en compartimentos intracelulares. La movilización de calcio intracelular por parte de la metadona depende únicamente del receptor μ . La producción de especies reactivas de oxígeno y el aumento de calcio conduce a la activación de PAD4 y a la citrulinación de histonas. Las trampas extracelulares de ADN inducidas por la metadona están decoradas con las histonas citrulinadas (H3Cit) y con triptasa.

En este estudio se observó la muerte celular a concentraciones relativamente altas de metadona (0.5 y 1 mM), similares a las descritas para que la morfina inhiba la señalización del receptor TLR4. En ensayos de unión en células transfectadas con el receptor μ humano, en cultivos neuronales y en células de neuroblastoma, entre otras preparaciones, las constantes de afinidad (K_i) para la morfina se encuentran en el rango de 1 a 100 nM y las de metadona de 0.1 a 100 nM (Brasel et al., 2008; Volpe et al., 2011; Yeadon y Kitchen, 1988). Sin embargo, no existe un ensayo que evalúe las K_i de los opioides en células del sistema inmune. Sólo se ha reportado

que las concentraciones de opioide utilizadas son elevadas en células del sistema inmune (Friesen et al., 2008, 2013; JungKnow et al., 2021; Madera-Salcedo et al., 2013; Singh et al., 2011). Por otro lado, la morfina y la metadona inducen la activación de este receptor a una concentración de 10 μ M, en células HEK293-hTLR4, en las que hay una expresión estable del receptor TLR4 en la membrana celular (Hutchinson et al., 2010). Sin embargo, hay que tener en cuenta que son células modificadas para poder estudiar a estos receptores. En este trabajo se utilizaron células del cultivo primario, que pueden representar de mejor manera lo que sucede en el organismo.

En este proyecto se demostró que la metadona requiere la convergencia de diferentes mecanismos para inducir la muerte celular, particularmente de la señalización de los receptores μ y TLR4. Es la activación de los receptores μ y TLR4 la que causa la muerte celular asociada a la formación de trampas extracelulares de ADN (MCETosis). Este es el primer reporte de este tipo de muerte celular inducido por la metadona. Hay evidencia en la literatura que indica que la activación del receptor μ por la metadona induce diferentes tipos de muerte celular. Por ejemplo, en células de Sertoli (TM4) sometidas a un modelo de dependencia a opioides *in vitro*, la metadona incrementa la concentración de caspasa3 escindida/pro-caspasa 3, lo que sugiere apoptosis (Pourhassanali et al., 2021). En otro estudio, el tratamiento crónico de metadona incrementó la expresión de marcadores asociados a necrosis en el cerebelo de ratas (Zamani et al., 2023).

Este trabajo demostró que los receptores μ y TLR4 participan en la MCETosis inducida por metadona en BMMCs. La formación de trampas extracelulares de ADN se ha observado en diferentes contextos. Por ejemplo, los receptores para productos de glicosilación avanzada (RAGE), receptores para IgG (Fc γ R), receptores a lectina, y otros asociados a la inmunidad innata que activan a MAPK incrementan el calcio intracelular y producen especies reactivas de oxígeno y eventualmente conducen a la extrusión de ADN en neutrófilos y otras células del sistema inmune (Chen et al., 2021; Hidalgo et al., 2022). También se ha demostrado que la activación de receptores dopaminérgicos media la formación de trampas

extracelulares de ADN en células de glioblastoma (Agrawal et al., 2021), lo que sugiere que la estimulación de distintos receptores acoplados a proteínas G conduce a la formación de trampas extracelulares de ADN.

El mecanismo principal propuesto para el aumento de calcio intracelular dependiente de opioides en células inmunes es la activación de la isoforma- β de la fosfolipasa C (PLC) a través de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G (Celik et al., 2016; Michalska et al., 2018). Como se demostró en el presente estudio, la activación del receptor μ por parte de la metadona induce la movilización de calcio intracelular, pero requiere de la participación del receptor TLR4 para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno. Pese a estos hechos no se debe descartar la participación de otras moléculas que conducen al estrés y muerte celular. Por ejemplo, se ha demostrado que la metadona induce la salida de calcio del retículo endoplásmico aumentando a la proteasa activada por calcio calpaína 1, lo que conduce a la formación de poros en la membrana mitocondrial por la proteína BCL2 y a la activación de la caspasa 12 y 3 (JungKwon et al., 2021).

No se debe descartar que la metadona afecta el número de mitocondrias y aumenta el calcio intracelular a través del receptor a IP3 conduciendo a la formación de poros en la membrana mitocondrial en células neuroblastoma y glioblastoma (Nylander et al., 2021; Perez-Alvarez et al., 2010). Lo anterior lleva a hipotetizar que la metadona activa al receptor μ , induciendo la activación del receptor a IP3 y aumentando el calcio intracelular en BMMCs. Además, se ha reportado que la metadona activa al receptor TLR4, lo que resulta en un aumento de las especies reactivas de oxígeno mediante la NADPH oxidasa, desencadenando la activación de PAD4. Este proceso lleva la citrulinación de histonas y a la descondensación del ADN, finalizando en la muerte celular por la formación de trampas extracelulares de ADN.

Las acciones principales de los opioides sobre las células del sistema inmune a través de la activación del receptor μ , se describen generalmente como inmunosupresoras (Li et al., 2002; Martin et al., 2010; Zhang et al., 2003). Sin embargo, los opioides son capaces de generar acciones proinflamatorias, las cuales están asociadas a la interacción de estos compuestos con el receptor TLR4

(Hutchinson et al., 2010, 2011; Wang X., et al., 2012b). Los datos de este trabajo sugieren que, para la inducción de la MCEtosis, la metadona activa al receptor μ , pero que parte de la maquinaria de señalización necesaria para inducir la muerte celular depende del receptor TLR4. Los resultados permiten hipotetizar dos posibilidades en el modelo utilizado: 1) la existencia de un dímero entre el receptor μ y TLR4, o 2) la convergencia de las cascadas de señalización de estos dos receptores.

Se han descrito distintos mecanismos de convergencia entre los receptores opioides y TLR. Por ejemplo, la señalización del receptor μ puede interrumpir la activación del receptor TLR4 (Franchi et al., 2019; Madera-Salcedo et al., 2013; Stevens et al., 2013) o los receptores μ -opioides y TLR4 pueden trabajar en conjunto para incrementar la activación de MAPKs y aumentar la secreción de mediadores proinflamatorios y citocinas (Chang y Karin, 2001; Cuitavi et al., 2023; Zhang et al., 2020). Aún faltan estudios para dilucidar estas vías de señalización, y podrían implicar la producción de compuestos intermediarios para coordinar la activación de un receptor tras otro. Otra posibilidad interesante es que la metadona podría inducir una interacción molecular estrecha entre los receptores μ y TLR4, ya que la colocalización entre ambos fue detectada mediante microscopía confocal y aumentó después del tratamiento con metadona. Algunas investigaciones han reportado la formación de complejos entre receptores acoplados a proteínas G y los receptores TLR4. Por ejemplo, el receptor activado por proteasa (PAR2), un receptor acoplado a proteínas G, forma un complejo con los receptores TLR4 para activar el factor de transcripción NF κ B en respuesta a péptidos agonistas sintéticos de PAR2 (Rallabhandi et al., 2008) y esta interacción es responsable de la contractilidad vascular tanto en un modelo *in vivo* de endotoxemia en ratas como en anillos aórticos aislados de rata (Bucci et al., 2013).

Estos resultados experimentales evidencian un nuevo mecanismo de interacción entre los receptores μ y TLR4 en células cebadas. También ayudan a entender la respuesta compleja de los opioides en células inmunes. Además, la formación diferencial de complejos de señalización que contienen a los receptores opioides y

TLR4 en distintas células podría explicar la diversa gama de acciones de los opioides. Es necesario continuar analizando la interacción de estos receptores y el mecanismo por el cual la metadona promueve esta interacción, causando MCETosis.

9. Conclusiones

La activación del receptor μ por parte morfina, fentanilo y metadona, previo a la activación del receptor TLR4 con LPS, inhibe la señalización del receptor TLR4 en células cebadas con diferencias en las concentraciones eficaces y los tiempos de estimulación.

La activación de los receptores μ y TLR4 por parte de la metadona produce muerte celular en BMMCs.

El fentanilo a concentraciones altas y tiempos de estimulación prolongados produce muerte celular en BMMCs.

La metadona es proinflamatoria cuando se administra sola, pero cuando se administra previo al LPS inhibe de la respuesta de las células cebadas.

La exposición prolongada a morfina, fentanilo o metadona bloquean la señalización del receptor TLR4.

10. Perspectivas

La estimulación prolongada del receptor μ induce un bloqueo de la respuesta del receptor TLR4. Este bloqueo podría estar relacionado con la expresión de IRAK-M y SHIP1, proteínas inhibitoras de IRAK4 y MyD88, respectivamente. Por lo tanto, sería conveniente:

1. Estudiar si los opioides cambian la expresión de estas proteínas, mediante PCR en tiempo real y *western blot*.
2. Determinar en qué tiempo se induce esta expresión, realizando un curso temporal con la técnica de PCR en tiempo real complementado con *western blot*.
3. Identificar si el receptor μ regula la expresión de IRAK-M y SHIP1, utilizando a la naloxona o a la β -FNA.
4. Analizar si la estimulación prolongada con morfina, fentanilo o metadona lleva a una degradación del receptor μ , evaluando su expresión mediante la técnica de *western blot*.

En células estimuladas durante 12 h con fentanilo, se observó una disminución de la viabilidad de las BMMCs de aproximadamente 30%. En otros estudios de muerte celular mediada por fentanilo, se ha observado que este opioide induce piroptosis, a diferencia de la MCETosis que se induce por la metadona. Por lo tanto, convendría:

1. Evaluar el tipo de muerte celular inducido por el fentanilo, en BMMCs. Para determinar si es piroptosis, se marcaría mediante inmunofluorescencia el inflammasoma (NLRP3) y al poro de GSDM-D (involucrados en la piroptosis), determinando su aumento de expresión mediante el incremento en la intensidad de fluorescencia. Para observar la formación de trampas extracelulares de ADN, se utilizaría al marcador DAPI.

2. Determinar la producción de especies reactivas de oxígeno y de calcio intracelular después de una estimulación con 1 mM de fentanilo durante 12 h, en BMMCs.
3. Evaluar si aumentan los niveles de la citocina IL-1 β , de la cual depende la formación del inflammasoma, mediante ELISA en BMMCs tratadas con fentanilo.

La muerte celular inducida por metadona en BMMCs depende de los receptores μ y TLR4, de la producción de especies reactivas de oxígeno y del aumento de calcio intracelular. Sin embargo, falta determinar:

1. Si la producción de especies reactivas de oxígeno proviene de la activación de la NADPH oxidasa, lo que se determinará mediante el uso de inhibidores de esta enzima, como el ML171.
2. Si la metadona altera a las mitocondrias mediante la utilización del reactivo MitoTracker (este marcador se une a mitocondrias activas y emite fluorescencia), la cual se puede observar mediante microscopía confocal.
3. Determinar si el aumento de calcio intracelular mediado por metadona proviene del retículo endoplásmico, se utilizará un inhibidor del receptor a inositol trifosfato (IP3R). Este receptor al activarse permite la salida de calcio del retículo endoplásmico al citosol, lo que conduce a una muerte celular. Un inhibidor de este receptor, como la xestospongina C, podría disminuir la salida de calcio del retículo endoplásmico y con ello la muerte celular mediada por la metadona.
4. Evaluar la formación de poros en la membrana mitocondrial inducida por la metadona, mediante la determinación de la secreción del citocromo C al citosol.
5. Observar la formación de trampas extracelulares de ADN mediada por la exposición repetida de metadona en un modelo *in vivo*. Administrar 6 dosis de metadona intraperitonealmente, al finalizar tomar lavados peritoneales y evaluar la formación de trampas extracelulares mediante inmunofluorescencia.

6. Determinar la participación del receptor μ -opioide en la secreción de TNF- α mediada por la metadona en ratones, con la ayuda de antagonistas opioides administrados previo al reto con metadona.
7. Determinar la participación del receptor TLR4 en la secreción de TNF- α inducida por la metadona en ratones, con la ayuda de ratones LPS/del. La metadona se administrará en ratones LPS/del o WT, después de 1 h se evaluará la secreción de TNF- α mediante lavados peritoneales. Se comparará la secreción de esta citocina en los ratones WT y LPS/del.

13. Referencias

- Agrawal, I., Sharma, N., Saxena, S., Arvind, S., Chakraborty, D., Chakraborty, D. B., Jha, D., Ghatak, S., Epari, S., Gupta, T., & Jha, S. (2021). Dopamine induces functional extracellular traps in microglia. *IScience*, *24*(1). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101968>
- Al-Khafaji, A. B., Tohme, S., Yazdani, H. O., Miller, D., Huang, H., & Tsung, A. (2016). Superoxide induces neutrophil extracellular trap formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism. *Molecular Medicine*, *22*, 621–631. <https://doi.org/10.2119/molmed.2016.00054>
- Author, G., Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C. Van, Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., & Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4. *Source: Science, New Series*, *282*(5396), 2085–2088.
- Bader, M., Alenina, N., Andrade-Navarro, M. A., & Santos, R. A. (2014). Mas and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacological Reviews*, *66*(4), 1080–1105. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008136>
- Bajic, D., Commons, K. G., & Soriano, S. G. (2013). Morphine-enhanced apoptosis in selective brain regions of neonatal rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *31*(4), 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.02.009>
- Batista, J., Guimaraes, M., & Dos-Santos, M. C. (2012). Opioids and the immune system: clinical relevance. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, *62*(5), 709–718. [https://doi.org/10.1016/S0034-7094\(12\)70169-1](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(12)70169-1)
- Berrozpe, G., Timokhina, I., Yukl, S., Tajima, Y., Ono, M., Zelenetz, A. D., & Besmer, P. (1999). The w^{sh}, w⁵⁷, and ph kit expression mutations define tissue-specific control elements located between 23 and 154 kb upstream of kit. *Blood*, *94*(8), 2658–2666. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/94/8/2658/1658643/2658.pdf>
- Bidlack, J. M., Khimich, M., Parkhill, A. L., Sumagin, S., Sun, B., & Tipton, C. M. (2006). Opioid receptors and signaling on cells from the immune system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *1*(3), 260–269. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9026-2>

- Birchall, K., & Gillet, V. J. (2011). Reduced graphs and their applications in chemoinformatics. In *Methods in Molecular Biology*, 672, pp. 197–212). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-839-3_8
- Biswas, S. K., & Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology*, 30(10), pp. 475–487). <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.009>
- Börner, C., Kraus, J., Bedini, A., Schraven, B., & Höllt, V. (2008). T-cell receptor/CD28-mediated activation of human T lymphocytes induces expression of functional μ -opioid receptors. *Molecular Pharmacology*, 74(2), 496–504. <https://doi.org/10.1124/mol.108.046029>
- Börner, C., Lanciotti, S., Koch, T., Höllt, V., & Kraus, J. (2013). Mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 263(1–2), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.07.012>
- Bosveld, C. J., Guth, C., Limjunyawong, N., & Pundir, P. (2023). Emerging role of the mast cell–microbiota crosstalk in cutaneous homeostasis and immunity. *Cells*, 12(22). <https://doi.org/10.3390/cells12222624>
- Brasel, C. M., Sawyer, G. W., & Stevens, C. W. (2008). A pharmacological comparison of the cloned frog and human mu opioid receptors reveals differences in opioid affinity and function. *European Journal of Pharmacology*, 599(1–3), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.09.043>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Bucci, M., Vellecco, V., Harrington, L., Brancaleone, V., Roviezzo, F., Mattace Raso, G., Ianaro, A., Lungarella, G., De Palma, R., Meli, R., & Cirino, G. (2013). Cross-talk between toll-like receptor 4 (TLR4) and proteinase-activated receptor 2 (PAR2) is involved in vascular function. *British Journal of Pharmacology*, 168(2), 411–420. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02205.x>
- Campillo-Navarro, M., Leyva-Paredes, K., Donis-Maturano, L., Rodríguez-López, G. M., Soria-Castro, R., García-Pérez, B. E., Puebla-Osorio, N., Ullrich, S. E., Luna-Herrera, J., Flores-Romo, L., Sumano-López, H.,

- Pérez-Tapia, S. M., Estrada-Parra, S., Estrada-García, I., & Chacón-Salinas, R. (2018). Mycobacterium tuberculosis catalase inhibits the formation of mast cell extracellular traps. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01161>
- Carranza-Aguilar, C. J., Espinosa-Riquer, Z. P., Martínez-Cuevas, F. L., & Cruz, S. L. (2022). Opioid receptors and neuronal signal transduction. In *Opioids: Pharmacology, Abuse, and Addiction* (pp. 175–195). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-09936-6_9
- Carranza-Aguilar, C. J., Hernández-Mendoza, A., Mejias-Aponte, C., Rice, K. C., Morales, M., González-Espinosa, C., & Cruz, S. L. (2020). Morphine and fentanyl repeated administration induces different levels of NLRP3-dependent pyroptosis in the dorsal raphe nucleus of male rats via cell-specific activation of TLR4 and opioid receptors. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(3), 677–694. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00957-5>
- Celik, M., Labuz, D., Henning, K., Busch-Dienstfertig, M., Gaveriaux-Ruff, C., Kieffer, B. L., Zimmer, A., & Machelska, H. (2016). Leukocyte opioid receptors mediate analgesia via Ca²⁺-regulated release of opioid peptides. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 227–242. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.018>
- Chan, Y. Y., Yang, S. N., Lin, J. C., Chang, J. L., Lin, J. G., & Lo, W. Y. (2015). Inflammatory response in heroin addicts undergoing methadone maintenance treatment. *Psychiatry Research*, 226(1), 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.12.053>
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410, 37–40. <https://doi.org/10.1038/35065000>
- Che, T., Dwivedi-Agnihotri, H., Shukla, A. K., & Roth, B. L. (2021). Biased ligands at opioid receptors: Current status and future directions. *Sci. Signal*, 14, 320. <https://www.science.org>
- Chen, T., Li, Y., Sun, R., Hu, H., Liu, Y., Herrmann, M., Zhao, Y., & Muñoz, L. E. (2021). Receptor-mediated NETosis on neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.775267>
- Concheiro, M., Chesser, R., Pardi, J., & Cooper, G. (2018). Postmortem toxicology of new synthetic opioids. *Frontiers in Pharmacology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01210>

- Cruz, S. L., & Granados-Soto, V. (2015). Opioids and opiates: pharmacology, abuse, and addiction. In *Neuroscience in the 21st Century* (pp. 1–33). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6434-1_156-1
- Cuitavi, J., Torres-Pérez, J. V., Lorente, J. D., Campos-Jurado, Y., Andrés-Herrera, P., Polache, A., Agustín-Pavón, C., & Hipólito, L. (2023). Crosstalk between Mu-Opioid receptors and neuroinflammation: Consequences for drug addiction and pain. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 145). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.105011>
- da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., & Oliver, C. (2014). Mast cell function: a new vision of an old cell. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 62(10), 698–738. <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
- Dang, V. C., & Christie, M. J. (2011). *Themed section: molecular pharmacology of GPCRs mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons.* <https://doi.org/10.1111/bph.2012.165.issue-6>
- Doll, C., Konietzko, J., Pöll, F., Koch, T., Höllt, V., & Schulz, S. (2011). Agonist-selective patterns of mu-opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies. *British Journal of Pharmacology*, 164(2), 294–297. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01387.x>
- Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y., & Wang, R. F. (2022). Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>
- Echtenacher, B., Männel, D., & Hültner, L. (1996). Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Letters to Nature*, 381, 75–77.
- Ellis, C. R., Kruhlak, N. L., Kim, M. T., Hawkins, E. G., & Stavitskaya, L. (2018). Predicting opioid receptor binding affinity of pharmacologically unclassified designer substances using molecular docking. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197734>
- Espinosa-Riquer, Z. P., Ibarra-Sánchez, A., Vibhushan, S., Bratti, M., Charles, N., Blank, U., Rodríguez-Manzo, G., & González-Espinosa, C. (2019). TLR4 receptor induces 2-AG-dependent tolerance to lipopolysaccharide and trafficking of CB2 receptor in mast cells. *The Journal of Immunology*, 202(8), 2360–2371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800997>
- Espinosa-Riquer, Z. P., Segura-Villalobos, D., Ramírez-Moreno, I. G., Pérez Rodríguez, M. J., Lamas, M., & Gonzalez-Espinosa, C. (2020). Signal

transduction pathways activated by innate immunity in mast cells: translating sensing of changes into specific responses. In *Cells* 9(11). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9112411>

- Faouzi, A., Varga, B. R., & Majumdar, S. (2020). Biased opioid ligands. *Molecules*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184257>
- Fessart, D., & Delom, F. (2011). Role of phosphorylation in the control of clathrin-mediated internalization of GPCR. *International Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1155/2011/246954>
- Fonseca, Z., Díaz-Godínez, C., Mora, N., Alemán, O. R., Uribe-Querol, E., Carrero, J. C., & Rosales, C. (2018). Entamoeba histolytica induce signaling via Raf/MEK/ERK for neutrophil extracellular trap (NET) formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00226>
- Franchi, S., Moschetti, G., Amodeo, G., & Sacerdote, P. (2019). Do all opioid drugs share the same immunomodulatory properties? A review from animal and human studies. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02914>
- Franchi, S., Panerai, A. E., & Sacerdote, P. (2007). Buprenorphine ameliorates the effect of surgery on hypothalamus-pituitary-adrenal axis, natural killer cell activity and metastatic colonization in rats in comparison with morphine or fentanyl treatment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(6), 767–774. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.01.001>
- Friesen, C., Bacher, S., Hormann, I., Roscher, M., & Miltner, E. (2011). Cytotoxic effects of opioids on cancer cell lines. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 49(1), 60–62. <https://doi.org/10.5414/CP49060>
- Friesen, C., Roscher, M., Alt, A., & Miltner, E. (2008). Methadone, commonly used as maintenance medication for outpatient treatment of opioid dependence, kills leukemia cells and overcomes chemoresistance. *Cancer Research*, 68(15), 6059–6064. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1227>
- Friesen, C., Roscher, M., Hormann, I., Fichtner, I., Alt, A., Hilger, R. A., Debatin, K. M., & Miltner, E. (2013). Cell death sensitization of leukemia cells by opioid receptor activation. *Oncotarget*, 4(5), 677–690. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.952>

- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, 12(11), 1035–1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>
- Gentek, R., Ghigo, C., Hoeffel, G., Bulle, M. J., Msallam, R., Gautier, G., Launay, P., Chen, J., Ginhoux, F., & Bajénoff, M. (2018). Hemogenic endothelial fate mapping reveals dual developmental origin of mast cells. *Immunity*, 48(6), 1160-1171.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.025>
- Gessi, S., Borea, P. A., Bencivenni, S., Fazzi, D., Varani, K., & Merighi, S. (2016). The activation of μ -opioid receptor potentiates LPS-induced NF- κ B promoting an inflammatory phenotype in microglia. *FEBS Letters*, 2813–2826. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12313>
- Goldmann, O., & Medina, E. (2012). The expanding world of extracellular traps: Not only neutrophils but much more. *Frontiers in Immunology*, 3(420). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00420>
- Gondin, A. B., Halls, M. L., Canals, M., & Briddon, S. J. (2019). GRK mediates μ -opioid receptor plasma membrane reorganization. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00104>
- Gonzalez-Espinosa, C., Madera-Salcedo, I. K., Molina-Martínez, L. M., & Martínez-Cuevas, F. L. (2022). Opioids and the immune system. In S. Cruz (Ed.), *Opioids* (pp. 249–285). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-09936-6_12
- Halcrow, P. W., Kumar, N., Hao, E., Khan, N., Meucci, O., & Geiger, J. D. (2022). Mu opioid receptor-mediated release of endolysosome iron increases levels of mitochondrial iron, reactive oxygen species, and cell death. *NeuroImmune Pharmacology and Therapeutics*, 2(1), 19–35. <https://doi.org/10.1515/nipt-2022-0013>
- Hidalgo, A., Libby, P., Soehnlein, O., Aramburu, I. V., Papayannopoulos, V., & Silvestre-Roig, C. (2022). Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. *Cardiovascular Research*, 118(13), 2737–2753. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab329>
- Hsiao, P. N., Chang, M. C., Cheng, W. F., Chen, C. A., Lin, H. W., Hsieh, C. Y., & Sun, W. Z. (2009). Morphine induces apoptosis of human endothelial

- cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. *Toxicology*, 256(1–2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.11.015>
- Hu, S., Sheng, W. S., Lokensgard, J. R., & Peterson, P. K. (2002). Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacology*, 42, 829–836. www.elsevier.com/locate/neuropharm
- Hutchinson, M. R., Shavit, Y., Grace, P. M., Rice, K. C., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2011). Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: An integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 772–810. <https://doi.org/10.1124/pr.110.004135>
- Hutchinson, M. R., Zhang, Y., Shridhar, M., Evans, J. H., Buchanan, M. M., Zhao, T. X., Slivka, P. F., Coats, B. D., Rezvani, N., Wieseler, J., Hughes, T. S., Landgraf, K. E., Chan, S., Fong, S., Phipps, S., Falke, J. J., Leinwand, L. A., Maier, S. F., Yin, H., ... Watkins, L. R. (2010). Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(1), 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.08.004>
- JungKwon, L., L., R. J., Hee-Guk, B., & Ki-Young, L. (2021). D, L-Methadone causes leukemic cell apoptosis via an OPRM1 - triggered increase in IP3R - mediated ER Ca²⁺ release and decrease in Ca²⁺ efflux, elevating [Ca²⁺]_i. *Scientific Reports*, 11(1009), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80520-w>
- King, P. T., Sharma, R., O'Sullivan, K., Selemidis, S., Lim, S., Radhakrishna, N., Lo, C., Prasad, J., Callaghan, J., McLaughlin, P., Farmer, M., Steinfurt, D., Jennings, B., Ngui, J., Broughton, B. R. S., Thomas, B., Essilfie, A. T., Hickey, M., Holmes, P. W., ... Holdsworth, S. R. (2015). Nontypeable haemophilus influenzae induces sustained lung oxidative stress and protease expression. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120371>
- Kliwer, A., Schmiedel, F., Sianati, S., Bailey, A., Bateman, J. T., Levitt, E. S., Williams, J. T., Christie, M. J., & Schulz, S. (2019). Phosphorylation-deficient G-protein-biased μ -opioid receptors improve analgesia and diminish tolerance but worsen opioid side effects. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08162-1>
- Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galá, J. E., Janeway, C. A., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor

siganling. *Cell*, 110, 191–202.
www.cell.com/cgi/content/full/110/2/191/DC1

Kong, L., & Ge, B. X. (2008). MyD88-independent activation of a novel actin-Cdc42/Rac pathway is required for Toll-like receptor-stimulated phagocytosis. *Cell Research*, 18(7), 745–755.
<https://doi.org/10.1038/cr.2008.65>

Lansu, K., Karpiak, J., Liu, J., Huang, X. P., McCorvy, J. D., Kroeze, W. K., Che, T., Nagase, H., Carroll, F. I., Jin, J., Shoichet, B. K., & Roth, B. L. (2017). In silico design of novel probes for the atypical opioid receptor MRGPRX2. *Nature Chemical Biology*, 13(5), 529–536.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2334>

Lemel, L., Lane, J. R., & Canals, M. (2020). GRKs as Key Modulators of Opioid Receptor Function. In *Cells* (Vol. 9, Issue 11). NLM (Medline).
<https://doi.org/10.3390/cells9112400>

Leshner, M., Wang, S., Lewis, C., Zheng, H., Chen, X. A., Santy, L., & Wang, Y. (2012). PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Frontiers in Immunology*, 3(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00307>

Li, Y., Wang, X., Tian, S., Guo, C.-J., Douglas, S. D., & Ho, W.-Z. (2002). Methadone enhances human immunodeficiency virus infection of human immune cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, 118–122.
<https://academic.oup.com/jid/article/185/1/118/799479>

Lin, M., Deng, K., Li, Y., & Wan, J. (2021). Morphine enhances LPS-induced macrophage apoptosis through a PPAR γ -dependent mechanism. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(1).
<https://doi.org/10.3892/etm.2021.10146>

Ma, K., Ma, P., Lu, H., Liu, S., & Cao, Q. (2017). Fentanyl suppresses the survival of CD4⁺ T cells isolated from human umbilical cord blood through inhibition of IKKs-mediated NF- κ B activation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 85(5), 343–349. <https://doi.org/10.1111/sji.12538>

Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L., & Gonzalez-Espinosa, C. (2011). Morphine decreases early peritoneal innate immunity responses in Swiss-Webster and C57BL6/J mice through the inhibition of mast cell TNF- α release.

Journal of Neuroimmunology, 232(1), 101–107.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.017>

- Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L., & Gonzalez-Espinosa, C. (2013). Morphine prevents lipopolysaccharide-induced TNF secretion in mast cells blocking IKK kinase activation and SNAP-23 phosphorylation: Correlation with the Formation of a β -arrestin2/TRAF6 Complex. *The Journal of Immunology*, 191(6), 3400–3409. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202658>
- Maher, D. P., Walia, D., & Heller, N. M. (2019). Suppression of human natural killer cells by different classes of opioids. *Anesthesia and Analgesia*, 128(5), 1013–1021. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004058>
- Malaviya, R., Ikeda, T., Roos, E., & Abraham, S. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Letters to Nature*, 381, 77–80. <https://doi.org/10.1038/381077a0>
- Martin, J. L., Koodie, L., Krishnan, A. G., Charboneau, R., Barke, R. A., & Roy, S. (2010). Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site. *American Journal of Pathology*, 176(2), 786–799. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090457>
- Martínez-Cuevas, F. L., Cruz, S. L., & González-Espinosa, C. (2019). *Diferencias en tráfico vesicular y señalización del receptor μ -opioide activado por morfina y fentanilo en células cebadas y posible participación del receptor TLR4*. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SEDE SUR.
- Mazahery, C., Benson, B. L., Cruz-Lebrón, A., & Levine, A. D. (2020). Chronic methadone use alters the CD8+ T cell phenotype in vivo and modulates its responsiveness ex vivo to opioid receptor and TCR stimuli. *The Journal of Immunology*, 204(5), 1188–1200. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900862>
- McLaughlin, P. J., McHugh, D. P., Magister, M. J., & Zagon, I. S. (2015). Endogenous opioid inhibition of proliferation of T and B cell subpopulations in response to immunization for experimental autoimmune encephalomyelitis. *BMC Immunology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0093-0>
- McNeil, B. D., Pundir, P., Meeker, S., Han, L., Udem, B. J., Kulka, M., & Dong, X. (2015). Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-

- allergic drug reactions. *Nature*, 519(7542), 237–241.
<https://doi.org/10.1038/nature14022>
- McQuay, H. J., Sullivan, A. F., Smallman, K., & Dickenson, A. (1989). Intrathecal opioids, potency and lipophilicity. *Pain*, 36, 111–115.
- Merighi, S., Gessi, S., Varani, K., Fazzi, D., Stefanelli, A., & Borea, P. A. (2013). Morphine mediates a proinflammatory phenotype via m-opioid receptor-PKC ϵ -Akt-ERK1/2 signaling pathway in activated microglial cells. *Biochemical Pharmacology*, 86(4), 487–496.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.05.027>
- Michalska, M., Schultze-Seemann, S., Kuckuck, I., Katzenwadel, A., & Wolf, P. (2018). Impact of methadone on cisplatin treatment of bladder cancer cells. *Anticancer Research*, 38(3), 1369–1375.
<https://doi.org/10.21873/anticancer.12360>
- Miller, Y. I., Choi, S. H., Wiesner, P., & Bae, Y. S. (2012a). The SYK side of TLR4: Signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. *British Journal of Pharmacology*, 167(5), 990–999.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02097.x>
- Miller, Y. I., Choi, S. H., Wiesner, P., & Bae, Y. S. (2012b). The SYK side of TLR4: Signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 167, Issue 5, pp. 990–999).
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02097.x>
- Molina-Martínez, L. M., González-Espinosa, C., & Cruz, S. L. (2014). Dissociation of immunosuppressive and nociceptive effects of fentanyl, but not morphine, after repeated administration in mice: Fentanyl-induced sensitization to LPS. *Brain, Behavior, and Immunity*, 42, 60–64.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.011>
- Möllerherm, H., von Köckritz-Blickwede, M., & Branitzki-Heinemann, K. (2016). Antimicrobial activity of mast cells: Role and relevance of extracellular DNA traps. *Frontiers in Immunology*, 7(265).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00265>
- Moon, T. C., St Laurent, C. D., Morris, K. E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y., & Befus, A. D. (2010). Advances in mast cell biology: New understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunology*, 3(2), 111–128. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.136>

- Nagata, Y., & Suzuki, R. (2022). FcεRI: A Master Regulator of Mast Cell Functions. *Cells*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/cells11040622>
- Nishida, M., Suda, R., Nagamatsu, Y., Tanabe, S., Onohara, N., Nakaya, M., Kanaho, Y., Shibata, T., Uchida, K., Sumimoto, H., Sato, Y., & Kurose, H. (2010). Pertussis toxin up-regulates angiotensin type 1 receptors through toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 15268–15277. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.076232>
- Nylander, E., Zellerroth, S., Nyberg, F., Grönbladh, A., & Hallberg, M. (2021). The effects of morphine, methadone, and fentanyl on mitochondria: A live cell imaging study. *Brain Research Bulletin*, 171(March), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.03.009>
- Perez-Alvarez, S., Cuenca-Lopez, M. D., de Mera, R. M. M. F., Puerta, E., Karachitos, A., Bednarczyk, P., Kmita, H., Aguirre, N., Galindo, M. F., & Jordán, J. (2010). Methadone induces necrotic-like cell death in SH-SY5Y cells by an impairment of mitochondrial ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(11), 1036–1047. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.024>
- Perez-Alvarez, S., Iglesias-Guimaraes, V., Solesio, M. E., Melero-Fernandez De Mera, R. M., Yuste, V. J., Galindo, M. F., & Jordán, J. (2011). Methadone induces CAD degradation and AIF-mediated necrotic-like cell death in neuroblastoma cells. *Pharmacological Research*, 63(4), 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.12.001>
- Pertiwi, K. R., de Boer, O. J., Mackaaij, C., Pabittei, D. R., de Winter, R. J., Li, X., & van der Wal, A. C. (2019). Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis. *Journal of Pathology*, 247(4), 505–512. <https://doi.org/10.1002/path.5212>
- Pourhassanali, N., Zarbakhsh, S., & Miladi-gorji, H. (2021). Morphine dependence and withdrawal-induced changes in mouse Sertoli cell (TM4) line: Evaluation of apoptotic , inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Reproductive Toxicology*, 105(September), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.09.004>
- Quang-Cantagrel, N. Do, Wallace, M. S., Ashar, N., & Mathews, C. (2001). Long-term methadone treatment: Effect on CD4+ lymphocyte counts and

- HIV-1 plasma RNA level in patients with HIV infection. *European Journal of Pain*, 5(4), 415–420. <https://doi.org/10.1053/eujp.2001.0262>
- Quentin, E., Belmer, A., & Maroteaux, L. (2018). Somato-Dendritic Regulation of Raphe Serotonin Neurons; A Key to Antidepressant Action. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00982>
- Rallabhandi, P., Nhu, Q. M., Toshchakov, V. Y., Piao, W., Medvedev, A. E., Hollenberg, M. D., Fasano, A., & Vogel, S. N. (2008). Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: A novel paradigm for receptor cooperativity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24314–24325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804800200>
- Reber, L. L., Sibilano, R., Mukai, K., & Galli, S. J. (2015). Potential effector and immunoregulatory functions of mast cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunology*, 8(3), 444–463. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.131>
- Rojavin, M., Szabo, I., Bussiere, J. L., Rogers, T. J., Adler, M. W., & Eisenstein, T. K. (1993). Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sciences*, 53(8), 997–1006. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90122-j](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90122-j)
- Saha, P., Yeoh, B. S., Xiao, X., Golonka, R. M., Singh, V., Wang, Y., & Vijay-Kumar, M. (2019). PAD4-dependent NETs generation are indispensable for intestinal clearance of *Citrobacter rodentium*. *Mucosal Immunology*, 12(3), 761–771. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0139-3>
- Saturnino, S. F., Prado, R. O., Cunha-Melo, J. R., & Andrade, M. V. (2010). *Endotoxin tolerance and cross-tolerance in mast cells involves TLR4, TLR2 and FcεR1 interactions and SOCS expression: perspectives on immunomodulation in infectious and allergic diseases*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/240>
- Singh, A., Jayanthan, A., Farran, A., Elwi, A. N., Kim, S. W., Farran, P., & Narendran, A. (2011). Induction of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells by the therapeutic opioid methadone and effective synergy with Bcl-2 inhibition. *Leukemia Research*, 35(12), 1649–1657. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.06.035>
- Sly, L., Reauh, M., Kalesnikoff, J., Song, C., & Krystal, G. (2004). LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Cell Press*, 21, 227–239.

- Sogos, V., Caria, P., Porcedda, C., Mostallino, R., Piras, F., Miliano, C., De Luca, M. A., & Castelli, M. P. (2021). Human neuronal cell lines as an in vitro toxicological tool for the evaluation of novel psychoactive substances. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22136785>
- Stenkamp, R. E., Teller, J D C, & Palczewski, K. (2002). Crystal Structure of Rhodopsin: A G-Protein-Coupled Receptor. In *ChemBioChem* (Vol. 3).
- Stevens, C. W., Aravind, S., Das, S., & Davis, R. L. (2013). Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4. *British Journal of Pharmacology*, 168(6), 1421–1429. <https://doi.org/10.1111/bph.12028>
- Stoiber, W., Obermayer, A., Steinbacher, P., & Krautgartner, W. D. (2015a). The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. *Biomolecules*, 5(2), 702–723. <https://doi.org/10.3390/biom5020702>
- Stoiber, W., Obermayer, A., Steinbacher, P., & Krautgartner, W. D. (2015b). The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. *Biomolecules*, 5(2), 702–723. <https://doi.org/10.3390/biom5020702>
- Suzuki, K., & Verma, I. M. (2008). Phosphorylation of SNAP-23 by I κ B Kinase 2 Regulates Mast Cell Degranulation. *Cell*, 134(3), 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.050>
- Tegeder, I., & Geisslinger, G. (2004). Opioids as modulators of cell death and survival - Unraveling mechanisms and revealing new indications. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 56, Issue 3, pp. 351–369). <https://doi.org/10.1124/pr.56.3.2>
- Tian, X., Kang, D. S., & Benovic, J. L. (2014). β -Arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 219, pp. 173–186). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41199-1_9
- Tramullas, M., Martínez-Cué, C., & Hurlé, M. A. (2007). Chronic methadone treatment and repeated withdrawal impair cognition and increase the expression of apoptosis-related proteins in mouse brain. *Psychopharmacology*, 193(1), 107–120. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0751-x>

- Tubaro, E., Avico, U., Zuccaro, P., Cavallo, G., Pac, R., Croce, C., Borelli, G., & Superiore di, Istituto. (1985). Morphine and methadone impact on human phagocytic physiology. *Int. J. Immunopharmac*, 7(6), 865–874.
- Ain U., Q., Batool, M., & Choi, S. (2020). TLR4-targeting therapeutics: Structural basis and computer-aided drug discovery approaches. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030627>
- Volpe, D. A., Tobin, G. A. M. M., Mellon, R. D., Katki, A. G., Parker, R. J., Colatsky, T., Kropp, T. J., & Verbois, S. L. (2011). Uniform assessment and ranking of opioid Mu receptor binding constants for selected opioid drugs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59(3), 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.12.007>
- Von Köckritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., & Medina, E. (2008). Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*, 111(6), 3070–3080. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-104018>
- Wang, T. Y., Lee, S. Y., Chang, Y. H., Chen, S. L., Chen, P. S., Chu, C. H., Huang, S. Y., Tzeng, N. S., Lee, I. H., Chen, K. C., Yang, Y. K., Chen, S. H., Hong, J. S., & Lu, R. B. (2018). Correlation of cytokines, BDNF levels, and memory function in patients with opioid use disorder undergoing methadone maintenance treatment. *Drug and Alcohol Dependence*, 191, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.06.024>
- Wang, X., Loram, L. C., Ramos, K., De Jesus, A. J., Thomas, J., Cheng, K., Reddy, A., Somogyi, A. A., Hutchinson, M. R., Watkins, L. R., & Yin, H. (2012a). Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6325–6330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200130109>
- Wang, X., Loram, L. C., Ramos, K., De Jesus, A. J., Thomas, J., Cheng, K., Reddy, A., Somogyi, A. A., Hutchinson, M. R., Watkins, L. R., & Yin, H. (2012b). Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6325–6330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200130109>
- Wang, Y., Matsushita, K., Jackson, J., Numata, T., Zhang, Y., Zhou, G., Tsai, M., & Galli, S. J. (2021). Transcriptome programming of IL-3-dependent bone marrow-derived cultured mast cells by stem cell factor (SCF). *Allergy*:

- European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 76(7), 2288–2291.
<https://doi.org/10.1111/all.14808>
- Wang, Y., Tang, Y., Teng, L., Wu, Y., Zhao, X., & Pei, G. (2006). Association of β -arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunology*, 7(2), 139–147.
<https://doi.org/10.1038/ni1294>
- Watari, K., Nakaya, M., & Kurose, H. (2014). Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases. *Journal of Molecular Signaling*, 9(1).
<https://doi.org/10.1186/1750-2187-9-1>
- Watkins, L. R., Hutchinson, M. R., Rice, K. C., & Maier, S. F. (2009). The “Toll” of Opioid-Induced Glial Activation: Improving the Clinical Efficacy of Opioids by Targeting Glia. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11), 581–591. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.08.002>
- West, P. W., & Bulfone-Paus, S. (2022). Mast cell tissue heterogeneity and specificity of immune cell recruitment. *Frontiers in Immunology*, 13(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.932090>
- Wetzel, M. A., Steele, A. D., Eisenstein, T. K., Adler, M. W., Henderson, E. E., & Rogers, T. J. (2000). μ -Opioid Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1, RANTES, and IFN- γ -Inducible Protein-10 Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *The Journal of Immunology*, 165(11), 6519–6524. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6519>
- Williams, J. T., Ingram, S. L., Henderson, G., Chavkin, C., von Zastrow, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C. J., & Christie, M. J. (2013). Regulation of μ -opioid receptors: Desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 223–254.
<https://doi.org/10.1124/pr.112.005942>
- Yeadon, M., & Kitchen, I. (1988). Comparative Binding of μ and δ Selective Ligands in Whole Brain and Pons/Medulla Homogenates From Rat: Affinity Profiles of Fentanyl Derivatives. *Neuropharmacology*, 21(4), 345–348.
- Yu, Y., Zhang, L., Yin, X., Sun, H., Uhl, G. R., & Wang, J. B. (1997). μ Opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28869–28874.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.28869>
- Zamani, N., Osgoei, L. T., Aliaghaei, A., Zamani, N., & Hassanian-Moghaddam, H. (2023). Chronic exposure to methadone induces activated microglia and

astrocyte and cell death in the cerebellum of adult male rats. *Metabolic Brain Disease*, 38(1), 323–338. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01108-z>

Zanoni, I., & Granucci, F. (2013). Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(JUL). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00032>

Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci, F., & Kagan, J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. *Cell*, 147(4), 868–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.051>

Zhang, N., Hodge, D., Rogers, T. J., & Oppenheim, J. J. (2003). Ca²⁺-independent protein kinase Cs mediate heterologous desensitization of leukocyte chemokine receptors by opioid receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12729–12736. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300430200>

Zhang, P., Yang, M., Chen, C., Liu, L., Wei, X., & Zeng, S. (2020). Toll-Like receptor 4 (TLR4)/Opioid receptor pathway crosstalk and impact on opioid analgesia, immune function, and gastrointestinal motility. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01455>

Zhang, R., Meng, J., Lian, Q., Chen, X., Bauman, B., Chu, H., Segura, B., & Roy, S. (2018). Prescription opioids are associated with higher mortality in patients diagnosed with sepsis: A retrospective cohort study using electronic health records. *PLoS ONE*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190362>

Zhang, T., Liu, R., Che, D., Pundir, P., Wang, N., Han, S., Cao, J., Lv, Y., Dong, H., Fang, F., Wang, J., Ma, P., Zhao, T., Lei, T., Dong, X., & He, L. (2019). A mast cell-specific receptor is critical for granuloma induced by intrathecal morphine infusion. *The Journal of Immunology*, 203(7), 1701–1714. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801423>

Zhuang, Y., Wang, Y., He, B., He, X., Zhou, X. E., Guo, S., Rao, Q., Yang, J., Liu, J., Zhou, Q., Wang, X., Liu, M., Liu, W., Jiang, X., Yang, D., Jiang, H., Shen, J., Melcher, K., Chen, H., ... Xu, H. E. (2022). Molecular recognition of morphine and fentanyl by the human μ -opioid receptor. *Cell*, 185(23), 4361–4375.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.041>

Zuo, Z. (2005). The role of opioid receptor internalization and β -arrestins in the development of opioid tolerance. *Anesthesia and Analgesia*, 101(3), 728–734. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000160588.32007.AD>



Article

Methadone Requires the Co-Activation of μ -Opioid and Toll-Like-4 Receptors to Produce Extracellular DNA Traps in Bone-Marrow-Derived Mast Cells

Frida L. Martínez-Cuevas ¹, Silvia L. Cruz ^{1,*} and Claudia González-Espinosa ^{1,2,*}

¹ Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav, IPN), Unidad Sede Sur, Calzada de los Tenorios No. 235, Col. Rinconada de las Hadas, México City CP 14330, Mexico; fridamartinezcuevas@cinvestav.mx

² Centro de Investigación Sobre el Envejecimiento, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav, IPN), Unidad Sede Sur, Calzada de los Tenorios, No. 235, Col. Rinconada de las Hadas, México City CP 14330, Mexico

* Correspondence: slcruz@cinvestav.mx (S.L.C.); cgonzal@cinvestav.mx (C.G.-E.)

Abstract: Methadone is an effective and long-lasting analgesic drug that is also used in medication-assisted treatment for people with opioid use disorders. Although there is evidence that methadone activates μ -opioid and Toll-like-4 receptors (TLR-4s), its effects on distinct immune cells, including mast cells (MCs), are not well characterized. MCs express μ -opioid and Toll-like receptors (TLRs) and constitute an important cell lineage involved in allergy and effective innate immunity responses. In the present study, murine bone-marrow-derived mast cells (BMMCs) were treated with methadone to evaluate cell viability by flow cytometry, cell morphology with immunofluorescence and scanning electron microscopy, reactive oxygen species (ROS) production, and intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) increase. We found that exposure of BMMCs to 0.5 mM or 1 mM methadone rapidly induced cell death by forming extracellular DNA traps (ETosis). Methadone-induced cell death depended on ROS formation and $[Ca^{2+}]_i$. Using pharmacological approaches and TLR4-defective BMMC cultures, we found that μ -opioid receptors were necessary for both methadone-induced ROS production and intracellular calcium increase. Remarkably, TLR4 receptors were also involved in methadone-induced ROS production as it did not occur in BMMCs obtained from TLR4-deficient mice. Finally, confocal microscopy images showed a significant co-localization of μ -opioid and TLR4 receptors that increased after methadone treatment. Our results suggest that methadone produces MCETosis by a mechanism requiring a novel crosstalk pathway between μ -opioid and TLR4 receptors.

Keywords: methadone; μ -opioid receptors; TLR4 receptors; mast cells; ETosis; mast cell extracellular traps



Citation: Martínez-Cuevas, F.L.; Cruz, S.L.; González-Espinosa, C. Methadone Requires the Co-Activation of μ -Opioid and Toll-Like-4 Receptors to Produce Extracellular DNA Traps in Bone-Marrow-Derived Mast Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 2137. <https://doi.org/10.3390/ijms25042137>

Academic Editor: Akiyoshi Takami

Received: 19 January 2024

Revised: 2 February 2024

Accepted: 6 February 2024

Published: 10 February 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Opioids are essential analgesics utilized in chronic pain treatment [1]; despite their efficacy, their use can lead to dependence and other unwanted effects in the central nervous system (CNS) and peripheral organs [1]. Among the clinically relevant opioid analgesic drugs, methadone is a long-lasting pharmacological agent used for cancer pain [2] and treatment for people with opioid use disorders as part of medication-assisted treatment (MAT) programs [3].

In vitro studies have shown that opioids produce immunomodulatory effects by altering distinct immune parameters, such as cytokine secretion, innate immune cell activation, and T-cell phenotypes [4–7]. Methadone particularly affects the normal function of T lymphocytes, monocytes, and natural killer (NK) cells [8–11].

Opioids can also produce inflammation-associated cell death [4–7,12,13]. In contrast with other opioids, methadone causes the death of leukemic cells [14,15], making it a relevant candidate for the control of cancer cell proliferation [16]. Like other opioid receptor agonists, methadone activates classical opioid G protein-coupled receptors (GPCR)

coupled to Gi/o proteins, producing inhibition of cAMP production and ion channel modulation [17]. On the other hand, methadone can also bind and activate Toll-like (TLR)-4 receptors, triggering the canonical NF- κ B-mediated signaling pathways with the resultant cytokine expression [18]. Due to the extensive use of methadone, the identification of receptors involved in its therapeutic and unwanted side effects is an active research field.

Despite existing information on the actions of methadone in immune cells, studies analyzing its effects on tissue-resident cell lineages, such as mast cells (MCs), are limited. MCs are myeloid cells that rapidly orchestrate inflammatory responses against microorganisms and tissue damage. They play a central role in acute allergic reactions by releasing histamine, proteases, and proinflammatory compounds after activating the high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI). They also trigger innate immunity responses against pathogens through the production of distinct cytokines and lipids after activating pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptor (TLR)-4 [19,20]. To orchestrate immune responses against pathogens, MCs can produce DNA-extracellular traps (MCETs) [21]. In such circumstances, nuclear DNA is extruded from the cells along with distinct proteins, such as citrullinated H3 histone and tryptase, leading to an extracellular-trap-related cell death called MCETosis [22,23]. MCs express functional opioid receptors coupled to the activation of MAPK [24]. Remarkably, distinct crosstalk events between opioid and TLR4 receptors have been reported in that cell type, mainly associated with the opioid-dependent inhibition of the TLR4-signaling cascade [25].

This study aimed to characterize the effects of methadone in bone-marrow-derived mast cells (BMMCs) together with the receptors and signaling pathways involved. We tested the hypothesis that methadone modifies the physiology of MCs with the participation of μ -opioid and TLR4 receptors. Our results show that (a) methadone causes BMMCs' death by inducing MCETosis, (b) ROS production and intracellular Ca²⁺ increase are essential for this process to occur, and (c) μ -opioid and TLR4 receptors closely interact to promote the formation of extracellular DNA traps (ET).

2. Results

2.1. Methadone Induces Cell Death in BMMCs in A Concentration-Dependent Manner

Stimulation of μ -opioid receptors can induce the death of neurons and other cells [12,13,26,27]. For this reason, we evaluated cell viability in BMMCs incubated with methadone (0.1, 0.5, and 1 mM) for 10 min, using phorbol myristate acetate (PMA, 1 μ M, for 4 h) as a positive control [28,29]. This time of PMA treatment was chosen based on time-course experiments previously conducted in our laboratory (Supplementary Figure S1). As expected, PMA caused 52.7% of BMMCs to die (Figure 1A). Methadone did not affect cell viability at 0.1 mM, but 0.5 mM and 1 mM produced 58% and 86.6% cell mortality, respectively ($F_{(4,19)} = 20.9$; $p < 0.0001$, one-way ANOVA; Figure 1B). To determine the time course of cell death occurrence, we incubated BMMCs with 0.5 or 1 mM methadone for 30 s, 2.5, or 5 min and found dead cells since the first 30 s (time: $F_{(4,30)} = 25.5$, $p < 0.0001$; dose: $F_{(1,30)} = 37.2$; $p = 0.0001$; interaction: $F_{(4,30)} = 3$, $p = 0.03$; two-way ANOVA for repeated measures; Figure 1C,D). These results indicate that methadone induces quick and concentration-dependent death in BMMCs.

2.2. Methadone Induces Cell Death through the Formation of DNA Extracellular Trap (MCETosis) in BMMCs

To investigate the type of cell death produced by methadone, we analyzed BMMCs treated with 0.5 mM or 1 mM for 10 min utilizing confocal microscopy and the DNA marker DAPI. Vehicle-treated cells had intact nuclei and plasmatic membranes. PMA and 0.5 mM methadone promoted the formation of cell clumps, and extracellular DNA was distinguished in some cells. At 1 mM, methadone produced DNA extrusion accompanied by nuclear and plasmatic membrane rupture, consistent with MCET formation (Figure 2A). The characteristic membrane ruffles of BMMCs (white arrow) in control cells were evident in electronic scanning microscopy images (Figure 2B). PMA induced cell clump formation

(orange arrow) and DNA secretion (blue arrow). Methadone, at 0.5 mM, induced cell clustering (orange arrow), the loss of membrane ruffles, DNA ET formation (blue arrow), and granular secretion (yellow arrow), accompanied by plasma membrane disruption (green arrow). At 1 mM, methadone caused massive DNA release and extrusion of granular materials and histones (pink arrow).

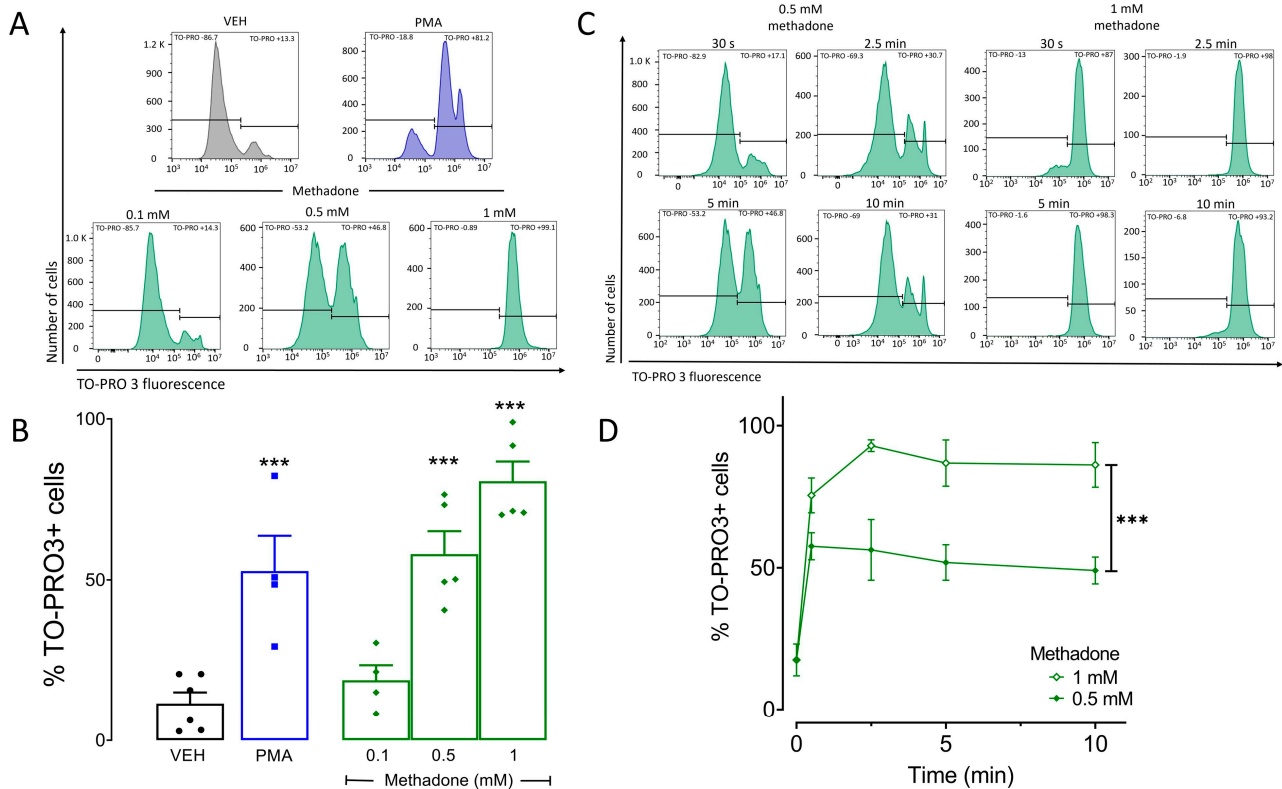


Figure 1. Methadone induces rapid death of BMMCs in a concentration-dependent manner. Five-hundred thousand BMMCs were exposed to different methadone concentrations. Cell viability was assessed by flow cytometry using TO-PRO3. (A) Representative histograms showing TO-PRO3-positive cells in control BMMCs treated with vehicle (VEH) and cells exposed to 1 μ M PMA for 4 h or to methadone (0.1, 0.5, or 1 mM) for 10 min. (B) Quantification of methadone-induced TO-PRO3-positive cells in the experiments described in A; *** $p < 0.001$; Dunnett's test. (C) Histograms of representative experiments depicting the time course of BMMC death caused by 0.5 mM or 1 mM methadone. (D) Quantification of TO-PRO3-positive cells in response to 0.5 mM or 1 mM methadone over time; *** $p < 0.001$, two-way ANOVA for repeated measures. Horizontal lines in (A,C) delimit the fluorescence values corresponding to TO-PRO negative and positive cells.

2.3. Methadone-Induced MCETs Contain CitH3 and Tryptase

To determine whether tryptase and CitH3 were present in methadone-induced MCE-Tosis, we tested two methadone concentrations and incubation times. Control cells treated with vehicle (VEH) showed cytoplasmic tryptase and intranuclear CitH3 (Figure 3). Methadone (0.5 mM) induced the clustering of MCs after a 2.5 min exposure and some tryptase-containing DNA traps were evident after 5 min. Exposure to 1 mM methadone for 2.5 min resulted in MCs clustering, nuclear content extrusion, and formation of ET positive to tryptase and CitH3 (white and yellow arrows). The same methadone concentration induced the rupture of all cells after 5 min of incubation. A 4 h PMA treatment caused effects comparable to those produced by 0.5 mM methadone for 5 min (Supplementary Materials Figure S2).

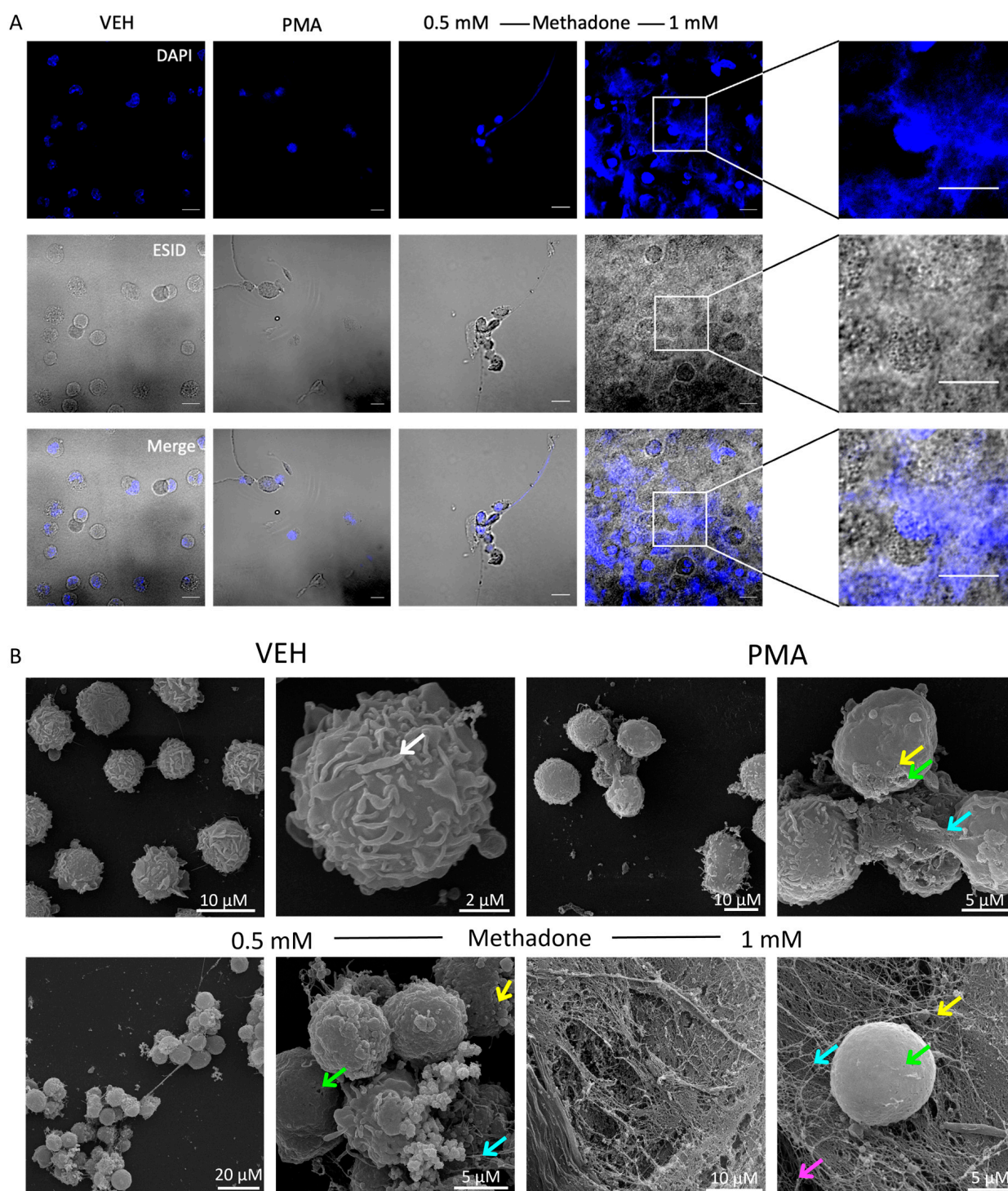


Figure 2. Methadone induces extracellular DNA trap formation in BMMCs. **(A)** Confocal images of control BMMCs treated with vehicle (VEH) for 10 min, 1 μM PMA for 4 h, or 0.5 mM or 1 mM methadone for 10 min. Nuclei were labeled using DAPI. A representative image from three distinct experiments performed with independent cultures of BMMCs is shown. Scale bar, 10 μm; objective 40×. **(B)** Scanning microscopy images of ET formation produced by PMA and methadone in BMMCs. The white arrow indicates membrane ruffling, and the green arrows point out discontinuities in the plasma membrane. The yellow arrow indicates small bodies, and the blue arrow shows DNA. Pink arrows indicate nucleosomes. Representative images from one of three independent experiments.

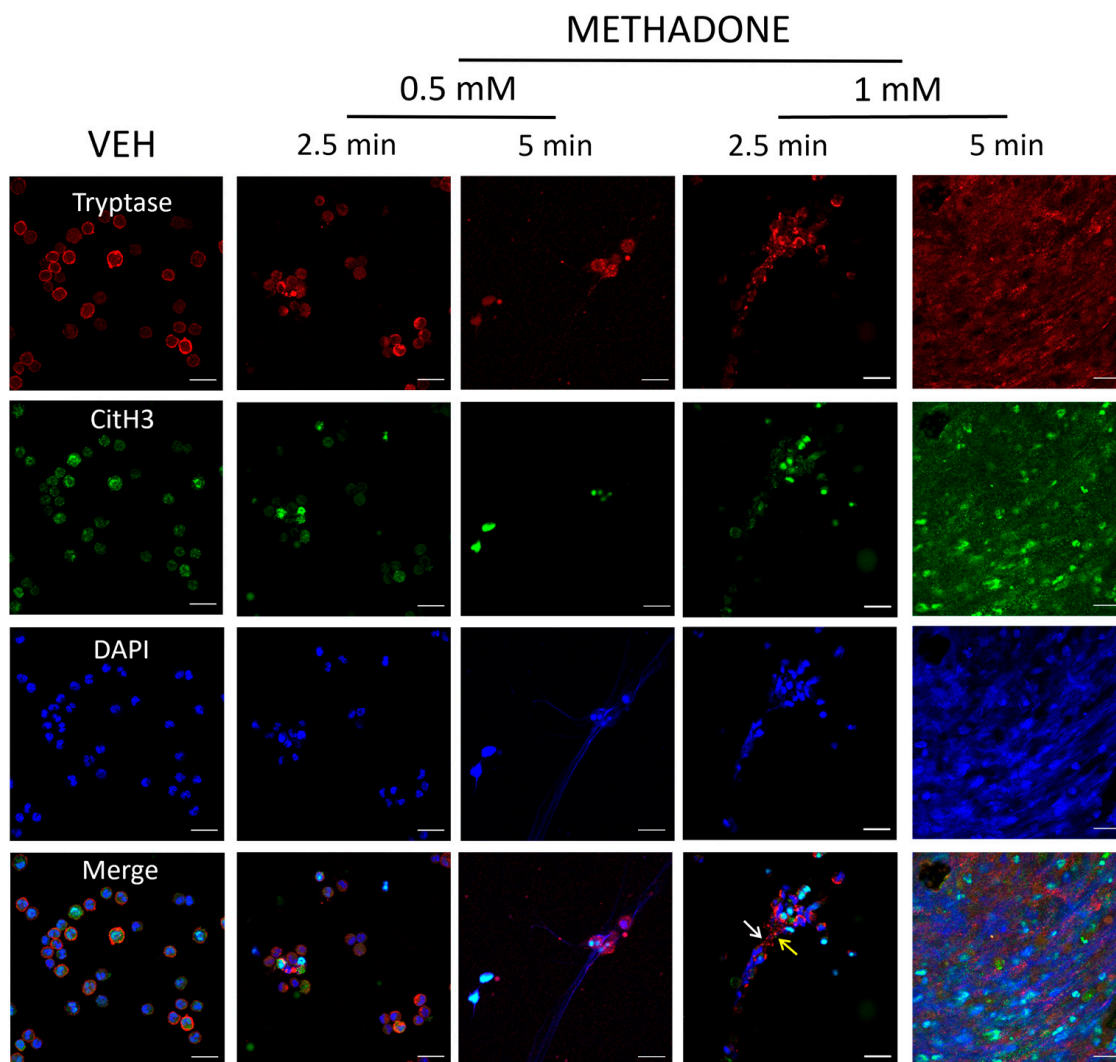


Figure 3. Methadone-induced MCETs contain tryptase and CitH3. Representative confocal microscopy images from three distinct experiments performed with independent BMMC cultures. Red: tryptase; green: CitH3; blue: DNA. Scale bar: 20 μ m, objective: 40 \times . BMMCs were treated with vehicle (VEH) for 5 min or methadone (0.5 or 1 mM) for 2.5 or 5 min. The white and yellow arrows indicate tryptase and CitH3 immunoreactivity, respectively.

In the remaining experiments, we used BMMCs treated with 0.5 mM methadone for 5 min to identify the receptors and signaling pathways involved in methadone-induced MCET formation.

2.4. ROS Production and Intracellular Ca^{2+} Increase Are Critical for Methadone-Induced Cell Death in BMMCs

To analyze whether ROS production was involved in methadone-induced MCETosis, we used DCFH2-DA, a compound that changes to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS. PMA and methadone almost doubled ROS levels in cell pellets and supernatants compared to control cells. No differences were observed between PMA and methadone, pellets, or supernatants ($F_{(3,20)} = 0.74$, $p = 0.4$; one-way ANOVA; Figure 4A). Next, we used the Ca^{2+} indicator Fura 2-AM to analyze the role of intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in methadone-induced cell death. Methadone produced a maximum $[Ca^{2+}]_i$ increase of 197.6 ± 34.1 nM compared to 125.3 ± 6.1 nM produced by PMA and 123.5 ± 3.5 nM observed in control BMMCs (Figure 4B).

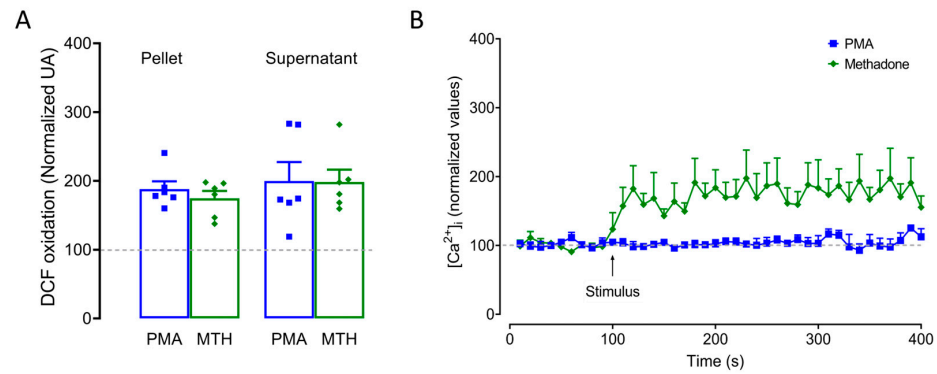


Figure 4. Methadone triggers ROS production and increases $[Ca^{2+}]_i$ in BMMCs. **(A)** Five-hundred thousand cells were loaded with DCF-DA for 30 min and then treated with PMA (1 μ M for 4 h) or 0.5 methadone for 5 min. The fluorescence intensity of the pellet and supernatant was used to measure intracellular and extracellular ROS production, respectively, using different BMMC cultures for each condition. Data were normalized to vehicle-treated BMMCs. **(B)** Five million BMMCs were loaded with Fura-2-AM, and basal fluorescence was recorded for 100 s, followed by stimulation with 1 μ M PMA or 0.5 mM methadone (MTH) for up to 300 s. For reasons of clarity, values for vehicle-treated cells are not shown.

To determine whether ROS production and Ca^{2+} increase participated in methadone-induced cell death, BMMCs were exposed to the antioxidant Trolox (10 mM) or the calcium chelator BAPTA (50 μ M) 15 min before methadone administration. We selected these concentrations because they have been used previously on BMMCs to block the increase in ROS and calcium under distinct stimuli [24]. Trolox and BAPTA pretreatments prevented methadone effects on cell death. Methadone induced 66.7% of cell death, and Trolox and BAPTA diminished that value to 47.6% and 44.2% ($F_{(2,11)} = 5.7$, $p < 0.01$, one-way ANOVA; Figure 5). This result indicates that ROS production and $[Ca^{2+}]_i$ increase play a significant role in cell death caused by methadone.

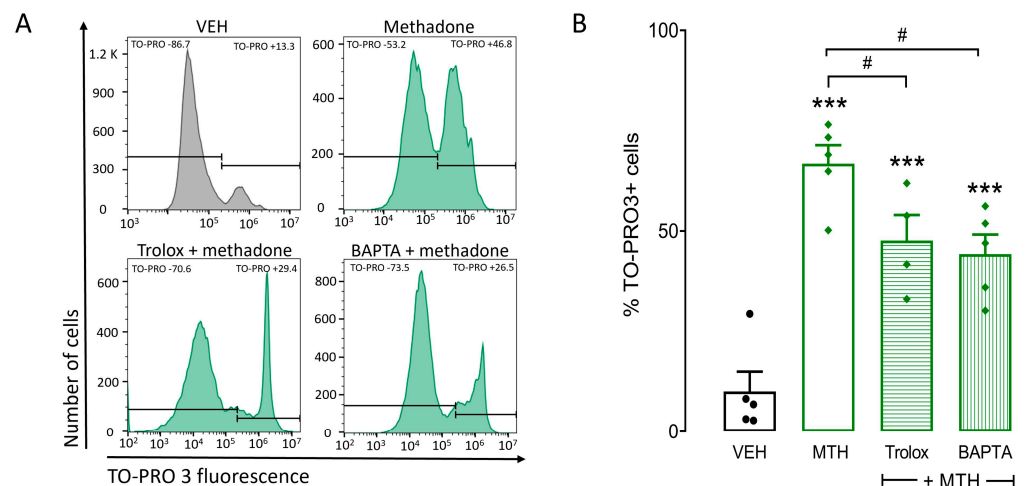


Figure 5. Methadone-induced BMMC death depends on increased $[Ca^{2+}]_i$. **(A)** One million BMMCs were incubated with vehicle (VEH) Trolox (10 mM) or BAPTA (50 μ M) for 15 min before exposure to 0.5 mM methadone for 5 min. Cells were then loaded with TO-PRO3, and cell viability was measured by flow cytometry. **(A)** Representative flow cytometry histograms corresponding to different treatments. Horizontal lines delimit the fluorescence values corresponding to TO-PRO negative and positive cells. **(B)** Percentage of TO-PRO3-positive cells. *** $p < 0.001$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. methadone; Dunnett's test. $n = 4$ –5 experiments using different BMMC cultures for each condition.

2.5. μ -Opioid and TLR4 Receptors Participate in Methadone-Induced Cell Death in BMMCs

To evaluate the role of μ -opioid receptors in methadone-induced cell death, we pre-treated BMMCs with 10 μ M of the non-selective opioid receptor antagonist naloxone or 1 μ M of the selective, irreversible μ -opioid receptor antagonist β -FNA for 15 min before methadone addition. Naloxone decreased methadone-induced cell death from 66.7% to 34.7%, whereas β -FNA reduced it to 40.4% ($F_{(2,12)} = 11.75$, $p < 0.001$, one-way ANOVA; Figure 6B). To analyze the role of TLR4 receptors, we generated BMMCs from LPS/del mice, a strain that does not express these receptors. Methadone produced 26.4% cell death in TLR4-defective BMMCs (Figure 6C), i.e., 40% less than in WT BMMCs subjected to the same treatment ($t = 3.75$; $p = 0.01$, Student's t -test). These experiments show that methadone produces death of BMMCs, acting on both the μ -opioid and TLR4 receptors.

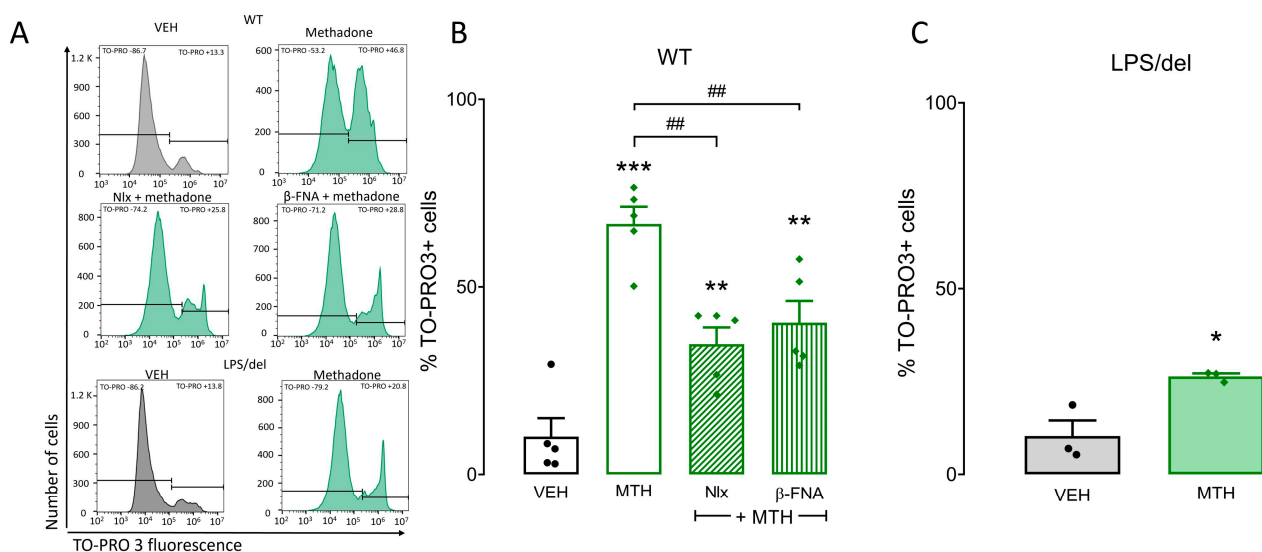


Figure 6. Methadone-induced cell death in BMMCs depends on μ -opioid and TLR4 receptors. One million BMMCs were pretreated with 10 μ M naloxone or 1 μ M β -FNA for 15 min before exposing them to 0.5 mM methadone (MTH) for 5 min. Cells were then loaded with TO-PRO3 to determine their viability by flow cytometry. (A) Representative flow cytometry histograms. Horizontal lines delimit the fluorescence values corresponding to TO-PRO negative and positive cells. (B) Percentage of TO-PRO3-positive cells in distinct conditions. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle (VEH); ## $p < 0.01$ vs. methadone; Dunnett's test. $n = 5$ experiments for each condition using different BMMC cultures. (C) Percentage of TO-PRO3-positive cells in distinct conditions. * $p < 0.05$ vs. vehicle; Student's t test. $n = 3$ experiments for each condition using different BMMC cultures.

2.6. μ -Opioid Receptors Require TLR4 Receptors to Mediate Methadone-Induced ROS Production

To determine whether μ -opioid receptors or TLR4 receptors participate in methadone-mediated ROS production, we treated BMMCs for 15 min with 10 μ M naloxone or 1 μ M β -FNA before methadone and measured ROS production 5 min later. Both opioid receptor antagonists decreased methadone-induced ROS levels (pellet: $F_{(2,11)} = 15.59$, $p < 0.001$; supernatant: $F_{(2,11)} = 7.134$, $p < 0.05$, one-way ANOVA; Figure 7A). There were no significant differences between the ROS produced by PMA or 0.5 mM methadone in the pellet or supernatant (pellet: $F_{(3,16)} = 16.5$, $p < 0.72$; supernatant: $F_{(3,16)} = 4.525$, $p > 0.9$, one-way ANOVA). We also measured ROS production in BMMCs derived from LPS/del mice stimulated with methadone. Methadone failed to produce ROS in these TLR4-defective BMMCs. Together, those results showed that μ -opioid receptors are necessary for methadone-induced ROS production, but they require the presence of TLR4 receptor to mediate that effect.

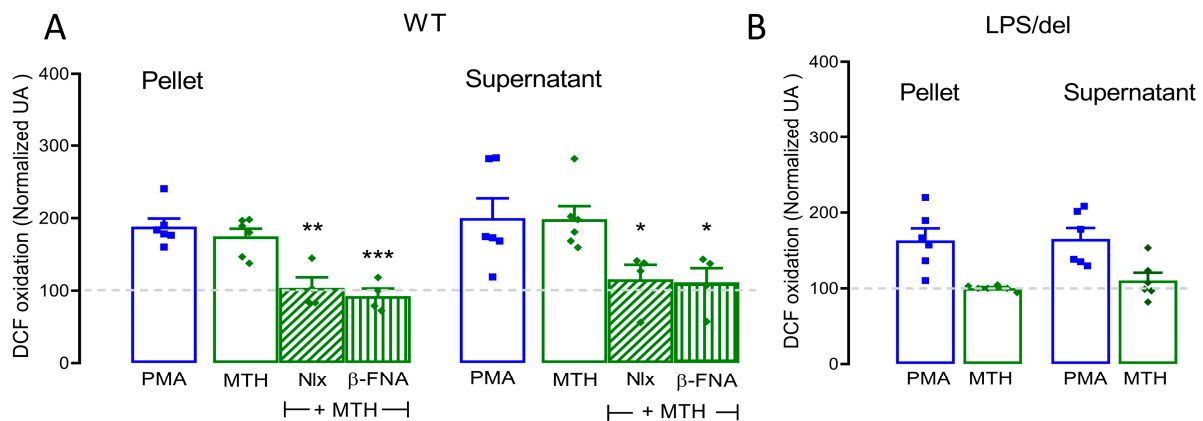


Figure 7. Methadone-induced ROS production is dependent on μ -opioid and TLR4 receptors. (A) Five hundred thousand cells were loaded with DCF-DA for 30 min, then pretreated with naloxone (10 μ M) or β -FNA (1 μ M) for 15 min before being exposed to 0.5 mM methadone (MTH) for 5 min. The fluorescence intensity of the pellet and supernatant was used to measure intracellular and extracellular ROS production, respectively; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. methadone, one-way ANOVA. $n = 4$ –7 experiments for each condition using different BMMC cultures. (B) Same treatment as in A, using LPS/del BMMCs. $n = 6$ experiments for each condition using different BMMC cultures. All data were normalized to values obtained from vehicle-treated BMMCs (dotted line).

2.7. μ -Opioid Receptors Induce Calcium Mobilization in BMMCs

To investigate whether μ -opioid receptors contributed to methadone-mediated $[Ca^{2+}]_i$ increase, cells were treated with 1 μ M β -FNA for 15 min. To evaluate the role of TLR4, we used BMMCs generated from LPS/del mice. β -FNA treatment diminished methadone-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in WT BMMCs (Figure 8A). Methadone also induced calcium mobilization in LPS/del cells, and this process was sensitive to β -FNA treatment (Figure 8B). These results show that the μ -opioid receptor is responsible for methadone-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in BMMCs.

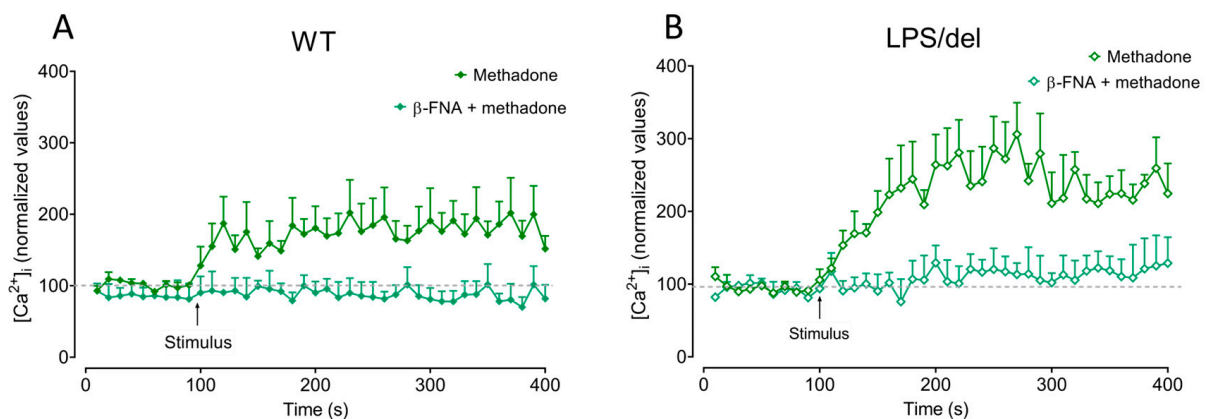


Figure 8. The increase in $[Ca^{2+}]_i$ produced by methadone depends on the μ -opioid receptor. (A) Five million WT BMMCs were loaded with Fura-2-AM, pretreated or not with 1 μ M β -FNA for 15 min. Basal fluorescence was recorded for 100 s. Then, methadone (0.5 mM final concentration) was added, and the response recorded for additional 300 s. (B) Calcium trace of TLR4-defective BMMCs treated with methadone or β -FNA plus methadone. $n = 3$ –6 experiments for each condition using different BMMC cultures.

2.8. μ -Opioid and TLR4 Receptors Share Intracellular Localization in BMMCs

Because the μ -opioid receptor was responsible for methadone-induced ROS production and that effect was not observed in the absence of TLR4 receptors, evidence of possible interaction between those molecules was collected utilizing confocal microscopy. BMMCs

were treated with vehicle or 0.1 mM methadone for 10 min before being processed for immunodetection of TLR4 and μ -opioid receptors. In vehicle-treated cells, both receptors were located in intracellular compartments (Figure 9A), showing detectable colocalization (Pearson's coefficient = 0.32 ± 0.05 and Manders' coefficient = 0.79 ± 0.02 ; Figure 9B), which was significantly increased by methadone treatment (Pearson's coefficient: $F_{(8,8)} = 1.170$; $p < 0.05$; Manders' coefficient: $F_{(8,8)} = 2.444$; $p < 0.05$; Student's *t*-test; Figure 9B). These results show that part of the μ -opioid and TLR4 receptors are located in the same intracellular compartments and that methadone treatment increases their recruitment to those sites.

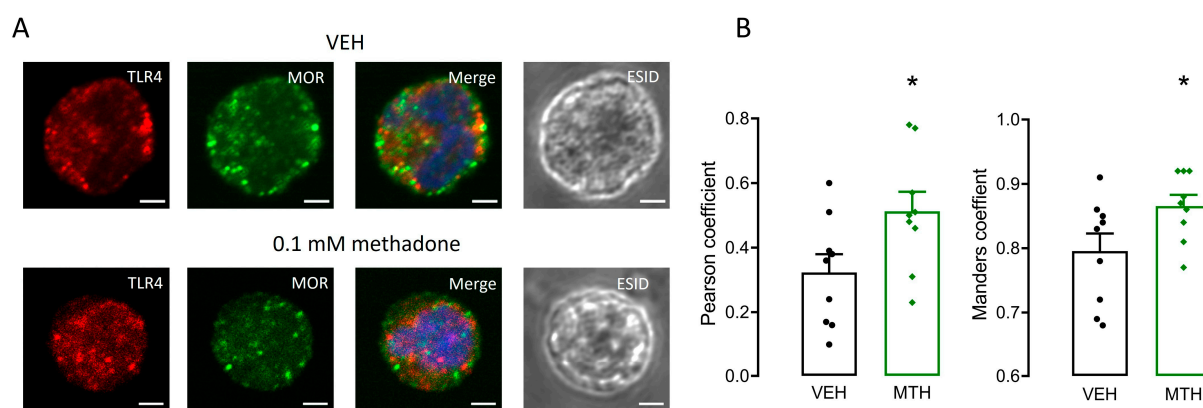


Figure 9. Methadone treatment increases intracellular co-localization of μ -opioid and TLR4 receptors in BMMCs. (A) Representative confocal microscopy images of vehicle (VEH)- or methadone (MTH)-treated cells. Red: TLR4 receptor, green: μ -opioid receptors (MOR), blue: DNA. Scale bar: 2 μ m, objective: 63 \times . Images from three distinct experiments performed with independent BMMC cultures. (B) Analysis of μ -opioid and TLR4 receptors colocalization by Pearson's and Manders' coefficients. * $p < 0.05$ vs. vehicle; Student's *t*-test. Mean values \pm SEM of 9 cells of 3 experiments using different BMMC cultures.

3. Discussion

Opioids have complex immunomodulatory properties [30,31]. They modify pathogen-induced cytokine secretion, microglial activation, lymphocyte maturation, and activation of macrophages and natural killer cells, among other effects [4,7]. In addition, opioids can induce cell death through different mechanisms, such as apoptosis, pyroptosis, and necrosis [4,7,12,13,26]. The receptors involved and the type of cell death differ according to the opioid compound, administration protocol, and cell type analyzed.

Opioids act on GPCRs and TLRs [18,32,33], triggering complex signaling pathways that involve signaling crosstalk to modulate cell fate and inflammation. The present results show the following findings: (1) methadone induces BMMC death by a process consistent with MCETosis; (2) methadone promotes ROS production and increases $[Ca^{2+}]_i$; (3) ROS and increased $[Ca^{2+}]_i$ are needed for methadone-induced MC death; (4) μ -opioid receptors are mainly responsible for methadone-induced ROS production and calcium mobilization; (5) methadone-promoted ROS production, but not calcium rise, depends on the presence of TLR4 receptors; and (6) μ -opioid and TLR4 receptors are colocalized in BMMCs and methadone further promotes colocalization (Figure 10).

Methadone, an opioid with a high affinity for the μ -opioid receptor, is frequently used for long periods by people with cancer pain or opioid use disorders. The effects of methadone on immune cells have been poorly described and they could involve long-term changes in inflammatory reactions or responses against pathogens. For example, the toxic effects of methadone have been shown in cell cultures [14,34–36]. As previously mentioned, opioid exposure can lead to cell death. For example, morphine, the prototypic opioid receptor agonist, induces apoptosis in human neurons and fetal microglia through μ -opioid receptor activation [37].

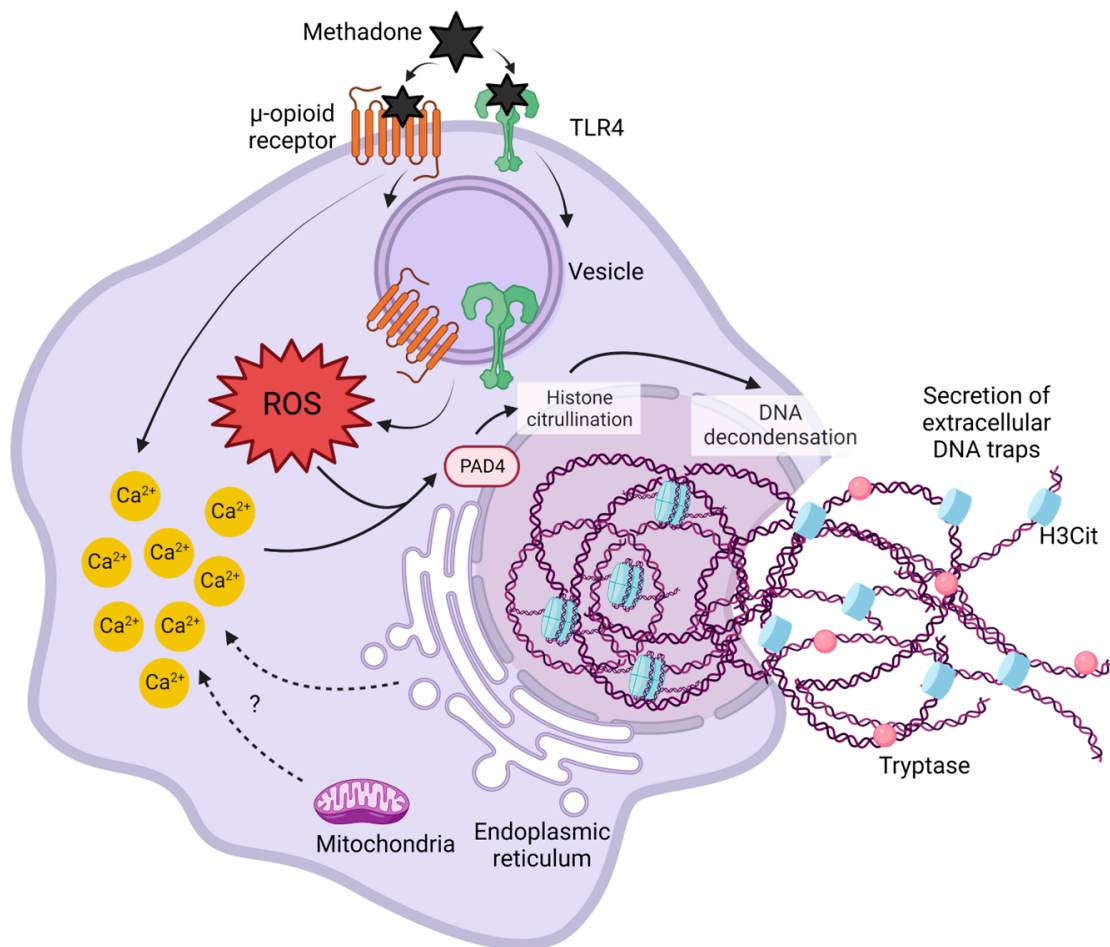


Figure 10. Methadone induces MCETosis by activating μ -opioid and TLR4 receptors. Methadone induces the formation of ETs in BMMCs by a mechanism that depends on ROS production and calcium mobilization. ROS generation after methadone treatment relies on μ -opioid receptor activation but requires the presence of TLR4 receptors, probably through close interaction occurring in intracellular compartments. Sources of intracellular calcium associated with ET formation in other immune cells are shown (mitochondria and endoplasmic reticulum). ROS production and calcium rise lead to PAD4 activation and histone citrullination. Methadone-induced ETs are decorated with citrullinated histones and tryptase.

Considering the fact that 1 mM morphine causes detectable effects on distinct signaling pathways in BMMCs [24], we started with 1 mM methadone, going downwards, to evaluate its effects on this cell preparation. Interestingly, 0.5 mM and 1 mM methadone induced the death of 54.17% and 83.2% of cells, respectively. Our results are in line with those reported in leukemia cells, where methadone induced apoptotic cell death at concentrations ranging from low to medium micromolar [13,34,36]. In the present study, we observed cell death at relatively high methadone concentrations (0.5 mM and 1 mM), suggesting that its deleterious effects occur at a wide concentration range.

Our results show that methadone requires the convergence of diverse mechanisms for cell death to occur, particularly μ -opioid and TLR4 receptor activation. However, we cannot rule out the participation of other molecules that could lead to cellular stress and cell death. Methadone activates distinct potassium channels [38–40], can act as a calcium ionophore [26] and causes cell death by the impairment of bioenergetic metabolism [13,26]. Whether those actions are involved in the rapid effect observed in BMMCs is still an open question.

Our results show that methadone causes extracellular DNA trap formation-associated cell death in BMMCs (MCETosis). To the best of our knowledge, this is the first report of this

type of cell death produced by methadone. Evidence from the literature indicates that μ -opioid receptor activation can induce different types of cell death. For example, methadone increased the cleaved caspase3/pro-caspase3 ratio, suggesting the induction of apoptosis in Sertoli (TM4) cells subjected to an in vitro model of opioid dependence [41]. In another study, chronic methadone treatment increased the expression of necroptosis-associated markers in the cerebellum of rats [42].

ET formation was first described as an early event induced by microbes in neutrophils. Since then, the primary function of ETs has been associated with the rapid killing of bacteria and the potentiation of inflammation [43]. The present results show that methadone induces MCETosis approximately 2.5 min after stimulation (Figure 3). This time is very short compared to that which has been observed with other cells and activators. However, there are also reports indicating that the formation of ETs can occur shortly after stimulation. For example, in HL-60 granulocytes and human neutrophils, TNF- α induces detectable ET formation in 10 to 15 min [43,44]; *Staphylococcus aureus*-induced nuclear envelope breakdown and DNA release can occur as early as 5 min after contact with human neutrophils [45]. In response to pathogens, some cytokines (e.g., IL-1 β or IL-23) or chemical compounds like PMA, MCET formation is triggered by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, leading to ROS production and an increase in intracellular calcium [21,22]. Those molecular changes result in peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) activation, which catalyzes the citrullination of histones, causing chromatin decondensation and cell death [46].

Our data show that opioid and TLR4 receptors are involved in methadone-induced MCETosis in BMMCs. Receptor-mediated ET formation has been observed in distinct contexts; for example, receptors for advanced glycation products (RAGE), IgG receptors (Fc γ R), C-type lectin receptors, and other innate-immunity-associated molecules are coupled to signaling cascades leading to MAPK activation, calcium increase, and ROS production that eventually led to the extrusion of DNA in neutrophils and other cells [47,48]. Also, dopaminergic receptors have been proposed to mediate the formation of dopamine-induced ETs in glioblastoma cells [49], suggesting that stimulation of GPCRs other than opioids can also lead to ETosis.

As shown in the present study, μ -opioid receptor activation contributes to methadone-induced cell death, ROS production, and calcium mobilization, whereas TLR4 receptors are required for μ -opioid receptor-mediated ROS production but not for calcium mobilization. The main mechanism proposed for opioid-dependent intracellular calcium rise in immune cells is activating the β -isoform of phospholipase C (PLC) by the $\beta\gamma$ subunits of G proteins [13,50]. However, although GPCR activation can lead to ROS production [51], our results strongly suggest that μ -opioid receptor-mediated ROS generation induced by methadone requires the presence of TLR4 receptors.

Actions of opioids in immune cells have been generally described as immunosuppressive through activation of μ -opioid receptors [9,52], although other classical opioid receptors (such as the δ subtype) have also been involved [53]. On the other hand, the proinflammatory actions of opioids in immune cells (e.g., microglia) have been associated with the interaction of these compounds with TLR4 receptors [18,54,55]. Evidence of opioid interaction with opioid and TLR4 receptors has led to the hypothesis that some in vivo actions of opiates are mediated by their proinflammatory actions through TLR4 triggering, whereas other effects are more related to the direct activation of classical GPCR-dependent signaling pathways [18,33,55,56]. Our data suggest that, for the induction of MCETosis, methadone activates μ -opioid receptors, but part of the signaling machinery needed to induce cell death relies on TLR4 receptor activation.

Distinct mechanisms of crosstalk between opioid and TLR receptors have been described. For example, μ -opioid signaling can interrupt TLR4 activation [24,31,57], or μ -opioid and TLR4 receptors can work alongside to activate MAPK or improve the release of proinflammatory mediators and cytokines [58–60]. The molecular mechanisms behind those pathways are far from being fully elucidated, as they could involve the production

of intermediary compounds to coordinate the activation of one receptor after the other. One exciting possibility is that methadone could induce a close molecular interaction between μ -opioid and TLR4 receptors, as colocalization of both proteins was detected by confocal microscopy, and this effect increased after methadone treatment. In other experimental models, direct interaction between GPCRs and TLR4 receptors to activate specific signaling pathways has been reported. For example, the protease-activated (PAR2) receptor forms a complex with TLR4 receptors to activate the NF κ B transcription factor in response to synthetic PAR2 agonist peptides [61]. Such close interaction was found to be responsible for vascular contractility in an in vivo model of endotoxemia in rats and on isolated rat aortic rings [62].

Our results provide experimental evidence to propose a new crosstalk mechanism between TLR4 and μ -opioid receptors in MCs and open new possibilities of μ -opioid and TLR4 receptor interactions (besides direct activation of TLR4 and μ -opioid receptors by opioid compounds). Those events should be taken into account to understand the complex responses of immune cells to opiates. Also, the differential formation of signaling complexes containing both TLR4 and μ -opioid receptors in distinct cells could explain, at least in part, the diverse range of opioid actions. Further analysis of that interaction and the mechanism by which methadone promotes it, causing MCETosis, is a matter for future studies.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

We used 20 C57BL/6J (stock no. 000664) and 15 B6.B10ScN-TLR4^{LPs/delJthJ} (stock No. 007227) mice from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Animals were kept under controlled temperature (22 to 24 °C) and humidity, with free access to food and water. Experimental procedures were approved by our Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL protocols 0137-15; 0074-13) and followed the ARRIVE guidelines for animal research [63].

4.2. Drugs, Reagents, and Antibodies

(D,L)-Methadone hydrochloride was kindly donated by the National Institute of Drug Abuse (NIDA) Drug Supply Program (North Carolina, United States of America). Naloxone hydrochloride (cat. Number: N-7758), β -funaltrexamine hydrochloride (β -FNA; cat. Number: 72786-10-8), and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; cat. Number: P-1585) were bought from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Based on previous reports from our lab and others, the methadone concentrations used in this paper ranged from 0.1 to 1 mM [24,26,64]. Opioids were dissolved in a sterile 0.9% saline solution before use. PMA was dissolved in 10% DMSO (cat. Number: D8418). The antioxidant Trolox (cat. Number: 648471; Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and the calcium chelator BAPTA (Merck Millipore 2787, Burlington, MA, USA) were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

TO-PROTM-3 iodide (cat. Number: T3605) was acquired from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) and used as a cell viability marker in a 1:1000 dilution. For immunofluorescence, we used the following antibodies: Anti-histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) (cat. Number: ab2378) was from Abcam (Cambridge, UK); mast cell tryptase (cat. Number: SC-32889) from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA); anti-mouse CD284 (TLR4) (cat. Number 145401) from BioLegend (San Diego, CA, USA); anti- μ -opioid receptor (cat. Number: MAB8629) from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); donkey anti-rabbit Alexa 568 (cat. Number: A10042) and donkey anti-rabbit Alexa 488 (cat. Number A21206) were from Invitrogen (Waltham, MA, USA); donkey anti-mouse Alexa 647 (cat. Number: A31571) and donkey anti-rat Alexa 594 (cat. Number A21209) were from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA); DAPI (cat. Number: D3571) was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). For scanning microscopy, reagents were provided by Laboratorios Nacionales de Servicios Experimentales (LANSE; CINVESTAV; Mexico City, Mexico). 2'7'-dichlorodihydrofluorescein

(DCFH₂-DA; cat. Number 2044-85-1), Fura 2-AM (cat. Number: 108964-32-5), and anti-DNP IgE (cat. Number: D8406) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). RPMI 1640 cell culture media (cat. Number: R4130), bovine serum (FBS; cat. Number: 26140079), penicillin (cat. Number: 15140122), antibiotic/antimycotic mixture (cat. Number: 15240062), pyruvate (cat. Number: 11360070), nonessential amino acids (cat. Number: 11140050), bovine serum albumin (BSA), EDTA-trypsin, and ProlongTM Diamond Antifade mountant (cat. Number P36970) were from Invitrogen (Waltham, MA, USA). TNF- α ELISA kit (cat. Number: 900-K54) and recombinant murine interleukin 3 (IL-3; cat. Number: 213-13x) were from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA).

4.3. BMMC Cultures

Bone marrow was isolated from the tibia of 5–6-week-old WT or TLR4^{LPS/del} mice. Bone marrow was cultured in 30 mL of RPMI medium supplemented with heat-inactivated 3 mL fetal bovine serum (FBS), 20 ng/mL IL-3, 20 mM HEPES, 1 \times of nonessential amino acids, 1 mM pyruvate, 100 UI/mL penicillin, and 10 μ g/mL streptomycin. For the TLR4^{LPS/del} cultures medium, 10 ng/mL of stem cell factor was added. The cell cultures were maintained in a humidified 37 °C incubator with 5% CO₂, changing the medium weekly. After 5–6 weeks, BMMCs were monitored by flow cytometry using a specific antibody against the Fc ϵ RI α -chain (cat. Number: 17-5898-80) from Life Biosciences (Boston, MA, USA), and only cultures with at least 98% of cells positive for this receptor were used. For in vitro experiments, BMMCs were sensitized with 100 ng/mL monoclonal anti-DNP IgE for 18 h.

4.4. Viability Test

BMMC viability was assessed after each treatment. Half a million BMMCs were resuspended in 100 μ L of PBS 1X with TO-PROTM-3 (1:1000 dilution). Cells were incubated for 5 min at room temperature and then analyzed by flow cytometry (Cytoflex S, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Sample analysis was performed using the software FlowJ 10.8.1 (Ashlan, OR, USA).

4.5. Immunofluorescence

To observe ETs, 0.5 \times 10⁶ BMMCs were resuspended in 10 μ L PBS 1X with DAPI (1:500 dilution), after which, the cells were placed in electrically charged slides for 10 min. To determine tryptase and CitH3 in MCETs, 0.5 \times 10⁶ BMMCs were put in loaded slides for 10 min. After that, they were washed once with PBS 1X; ice-cold 4% PFA for fixation was added for 20 min. Blocking was performed for 1 h using a solution of 4% BSA, 5% donkey serum, and 0.05% tween 20. After blocking at room temperature, cells were incubated with the specific primary Abs (rat anti-Histone H3 and rabbit anti-mast cell tryptase) and diluted in blocking solution overnight at 4 °C. Dilutions of both primary Abs were 1:300. Then, ten distinct washed with PBS 1X were performed, followed by incubation with secondary Abs (donkey anti-rabbit Alexa 568 and donkey anti-mouse Alexa 647; 1:400) and DAPI (1:500 dilution) for 2 h. Slides were then washed with PBS 1X. Slides were covered with Antifade Reagent and sealed using a coverslip. To analyze μ -opioid and TLR4 receptors intracellular localization, 0.5 \times 10⁶ BMMCs were subjected to the same process described for MCETs with the following antibodies: primary Abs rabbit anti- μ -opioid receptor (1:350) and rat anti-TLR4 receptor (1:300), and secondary abs donkey anti-rat 594 (1:400) and donkey anti-rabbit 488 (1:500). Cells were analyzed by confocal microscopy using a Zeiss LSM 800 model AX10 (Oberkochen, Germany) and the ZEN 2.3 blue edition software. Manders and Pearson coefficients were calculated utilizing the ZEN2.3 blue edition.

4.6. Scanning Electron Microscopy

One million BMMCs were left to stand in electrically charged slides for 10 min. Then, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde for 1 h at room temperature. After fixing, samples were washed thrice with PBS 1X and post-fixed with 1% osmium tetroxide (OsO₄) for 1 h. Slides were washed three times with PBS 1X and dehydrated in graded ethanol dilutions: first 50% ethanol, followed by 60% ethanol, and successively by 70%, 80%, 90%, and 100% ethanol, for 10 min each dilution. Finally, samples were dried in a chamber of critical drying point and were coated with a gold–argon method. We used a JSM-6510LV scanning electron microscope JEOL (Tokyo, Japan) to scan the cells.

4.7. Determination of ROS Production

Intracellular ROS production was determined utilizing the fluorochrome 2′7′-Dichloro-fluorescein diacetate (DCFH₂-DA). Briefly, 0.5 × 10⁶ BMMCs were incubated with 10 μM DCFH₂-DA in Tyrode’s buffer for 30 min at 37 °C. Then, cells were centrifuged at 750 × *g* for 5 min at room temperature; the supernatant was discarded, and cells were re-suspended in 500 μL Tyrode’s buffer. Cells were stimulated with the vehicle, 0.5 mM Methadone or PMA (25 nM concentration). At the end of the stimulus, cells were centrifuged at 12,000 × *g* for 5 min at 4 °C. The supernatant was recollected, and the cell pellets were disrupted by 300 μL of IGEPAL (0.1%) and pipetted vigorously. Subsequently, samples (pellet and supernatant) were centrifuged at 12,000 × *g* for 5 min. A measure of 200 μL of the samples were placed in a 96-well black plate. Finally, the fluorescence of each sample was measured on a BioTek Microplate luminometer (FLx800) from Biotek (Winooski, VT, USA) with λ_{excitation/emission} = 488/565. Intracellular and extracellular ROS are shown as arbitrary fluorescence units concerning the basal vehicle stimulation.

4.8. Determination of Intracellular Calcium

Intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) was determined with Fura 2-AM. Five million BMMCs were loaded with 1 μM Fura 2-AM for 15 min at 37 °C. After that, cells were washed two times, re-suspended in 1 mL of Tyrode’s/BSA buffer, and placed in a cuvette. The cells’ changes in fluorescence were determined in a Fluoromax x spectrofluorometer (Jobin Yvon, Horiba, Kyoto, Japan) a λ_{excitation/emission} = 340/510 nm in intervals of 1.16 s. The cells were held at 37 °C and under agitation during the experiment. Cells were recorded for 100 s (basal fluorescence) and, after 100 s, they were stimulated with PMA or Methadone to the 500 s. The maximum fluorescence (F_{max}) of each sample was determined by the cells lysing with 10% Triton, and the minimum fluorescence (F_{min}) was obtained with a Ca²⁺ chelating agent, EGTA (200 nM). Ultimately, the [Ca²⁺]_i was calculated using the method of Grynkiewicz [65] as follows, where *Kd* is the dissociation constant of Fura 2-AM (224 nM):

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \left(\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right)$$

The data were normalized and reported as the fold-change of the [Ca²⁺]_i basal fluorescence.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25042137/s1>.

Author Contributions: F.L.M.-C.: conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, data curation, visualization, and writing—original draft preparation. S.L.C.: conceptualization, resources, visualization, supervision, funding acquisition, writing—review and editing. C.G.-E.: conceptualization, resources, visualization, supervision, management, project administration, funding purchase, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Council for Humanities, Sciences, and Technologies (Conahcyt), Mexico, through Grant CF-2019-51488 to CGE and PhD scholarship No. 753297 to FLMC.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Intern Committee for the Use and Care of Laboratory Animals (CICUAL), Cinvestav, Protocol Number 0137-15.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available upon request to the corresponding author.

Acknowledgments: All data included in this work constitute the Ph.D. Thesis in Neuropharmacology and Experimental Therapeutics of Frida L. Martínez-Cuevas. The authors want to thank Alfredo Ibarra-Sánchez for full technical assistance and the generation of the BMMCs utilized in the experiments; Araceli Hernández-Mendoza for technical assistance in immunofluorescence and the acquisition of confocal images; Jorge Fernández, Ricardo Gaxiola, María Antonieta López, and Benjamín Chávez from the UPEAL, Cinvestav, for the maintenance of the colonies of LPS del mice; Rodolfo Pérez for mice maintenance at Cinvestav, South Campus; José A. Padilla from the National Autonomous University of Mexico for special technical assistance and discussion of data; María de Lourdes Rojas Morales from National Laboratories of Experimental Services (LANSE; Cinvestav) for technical assistance and the acquisition of scanning electron images; National Laboratory of Flow Cytometry (LabNalCit), from the National Autonomous University of Mexico for technical assistance on the cell viability analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Volkow, N.; Benveniste, H.; McLellan, A.T. Annual Review of Medicine Use and Misuse of Opioids in Chronic Pain. *Annu. Rev. Med.* **2017**, *69*, 451–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fredheim, O.M.S.; Moksnes, K.; Borchgrevink, P.C.; Kaasa, S.; Dale, O. Clinical pharmacology of methadone for pain. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **2008**, *52*, 879–889. [[CrossRef](#)]
3. Ma, J.; Bao, Y.-P.; Wang, R.-J.; Su, M.-F.; Liu, M.-X.; Li, J.-Q.; Degenhardt, L.; Farrell, M.; Blow, F.C.; Ilgen, M.; et al. Effects of medication-assisted treatment on mortality among opioids users: A systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry* **2019**, *24*, 1868–1883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ma, K.; Ma, P.; Lu, H.; Liu, S.; Cao, Q. Fentanyl Suppresses the Survival of CD4⁺ T Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood through Inhibition of IKKs-mediated NF- κ B Activation. *Scand. J. Immunol.* **2017**, *85*, 343–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mazahery, C.; Benson, B.L.; Cruz-Lebrón, A.; Levine, A.D. Chronic Methadone Use Alters the CD8⁺ T Cell Phenotype In Vivo and Modulates Its Responsiveness Ex Vivo to Opioid Receptor and TCR Stimuli. *J. Immunol.* **2020**, *204*, 1188–1200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Quang-Cantagrel, N.D.; Wallace, M.S.; Ashar, N.; Mathews, C. Long-term methadone treatment: Effect on CD4⁺ lymphocyte counts and HIV-1 plasma RNA level in patients with HIV infection. *Eur. J. Pain* **2001**, *5*, 415–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Rojavin, M.; Szabo, I.; Bussiere, J.L.; Rogers, T.J.; Adler, M.W.; Eisenstein, T.K. Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sci.* **1993**, *53*, 997–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Li, Y.; Wang, X.; Tian, S.; Guo, C.; Douglas, S.D.; Ho, W. Methadone Enhances Human Immunodeficiency Virus Infection of Human Immune Cells. *J. Infect. Dis.* **2014**, *1*, 118–122. [[CrossRef](#)]
9. Börner, C.; Lanciotti, S.; Koch, T.; Höllt, V.; Kraus, J. Mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* **2013**, *263*, 35–42. [[CrossRef](#)]
10. Kafami, L.; Etesami, I.; Felfeli, M.; Enayati, N.; Ghiaghi, R.; Aminian, A.; Dehpour, A. Methadone diminishes neuroinflammation and disease severity in EAE through modulating T cell function. *J. Neuroimmunol.* **2013**, *255*, 39–44. [[CrossRef](#)]
11. Klimas, N.G.; Blaney, N.T.; Morgan, R.O.; Chitwood, D.; Milles, K.; Lee, H.; Fletcher, M. Immune Function and Anti-HTLV-I/II Status in Anti-HIV-I-Negative Intravenous Drug Users Receiving Methadone. *Am. J. Med.* **1991**, *90*, 163–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Carranza-Aguilar, C.J.; Hernández-Mendoza, A.; Mejias-Aponte, C.; Rice, K.C.; Morales, M.; González-Espinosa, C.; Cruz, S.L. Morphine and Fentanyl Repeated Administration Induces Different Levels of NLRP3-Dependent Pyroptosis in the Dorsal Raphe Nucleus of Male Rats via Cell-Specific Activation of TLR4 and Opioid Receptors. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2022**, *42*, 677–694. [[CrossRef](#)]
13. Lee, J.; Rosales, J.L.; Byun, H.-G.; Lee, K.-Y. d,l-Methadone causes leukemic cell apoptosis via an OPRM1-triggered increase in IP3R-mediated ER Ca²⁺ release and decrease in Ca²⁺ efflux, elevating [Ca²⁺]_i. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1009. [[CrossRef](#)]
14. Friesen, C.; Bacher, S.; Hormann, I.; Roscher, M.; Miltner, E. Cytotoxic effects of opioids on cancer cell lines. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *49*, 60–62.
15. Michalska, M.; Schultze-Seemann, S.; Kuckuck, I.; Katzenwadel, A.; Wolf, P. Impact of methadone on cisplatin treatment of bladder cancer cells. *Anticancer. Res.* **2018**, *38*, 1369–1375. [[CrossRef](#)]

16. Theile, D.; Mikus, G. Methadone against cancer: Lost in translation. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 1840–1848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Williams, J.T.; Ingram, S.L.; Henderson, G.; Chavkin, C.; von Zastrow, M.; Schulz, S.; Koch, T.; Evans, C.J.; Christie, M.J. Regulation of μ -opioid receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 223–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hutchinson, M.R.; Zhang, Y.; Shridhar, M.; Evans, J.H.; Buchanan, M.M.; Zhao, T.X.; Slivka, P.F.; Coats, B.D.; Rezvani, N.; Wieseler, J.; et al. Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav. Immun.* **2010**, *24*, 83–95. [[CrossRef](#)]
19. John, A.L.S.; Abraham, S.N. Innate Immunity and Its Regulation by Mast Cells. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 4458–4463. [[CrossRef](#)]
20. Galli, S.J.; Gaudenzio, N.; Tsai, M. Mast Cells in Inflammation and Disease: Recent Progress and Ongoing Concerns. *Annu. Rev. Immunol.* **2020**, *38*, 49–77. [[CrossRef](#)]
21. Möllerherm, H.; von Köckritz-Blickwede, M.; Branitzki-Heinemann, K. Antimicrobial activity of mast cells: Role and relevance of extracellular DNA traps. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 265. [[CrossRef](#)]
22. Pertiwi, K.R.; de Boer, O.J.; Mackaaij, C.; Pabittei, D.R.; de Winter, R.J.; Li, X.; van der Wal, A.C. Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis. *J. Pathol.* **2019**, *247*, 505–512. [[CrossRef](#)]
23. Goldmann, O.; Medina, E. The expanding world of extracellular traps: Not only neutrophils but much more. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Madera-Salcedo, I.K.; Cruz, S.L.; Gonzalez-Espinosa, C. Morphine Prevents Lipopolysaccharide-Induced TNF Secretion in Mast Cells Blocking I B Kinase Activation and SNAP-23 Phosphorylation: Correlation with the Formation of a β -Arrestin/TRAFF6 Complex. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 3400–3409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Espinosa-Riquer, Z.P.; Segura-Villalobos, D.; Ramírez-Moreno, I.G.; Rodríguez, M.J.P.; Lamas, M.; Gonzalez-Espinosa, C. Signal Transduction Pathways Activated by Innate Immunity in Mast Cells: Translating Sensing of Changes into Specific Responses. *Cells* **2020**, *9*, 2411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Perez-Alvarez, S.; Cuenca-Lopez, M.D.; de Mera, R.M.M.-F.; Puerta, E.; Karachitos, A.; Bednarczyk, P.; Kmita, H.; Aguirre, N.; Galindo, M.F.; Jordán, J. Methadone induces necrotic-like cell death in SH-SY5Y cells by an impairment of mitochondrial ATP synthesis. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)—Mol. Basis Dis.* **2010**, *1802*, 1036–1047. [[CrossRef](#)]
27. Li, M.-C.; Yu, J.-H.; Yu, S.-S.; Chi, Y.-Y.; Xiang, Y.-B. MicroRNA-873 Inhibits Morphine-Induced Macrophage Apoptosis by Elevating A20 Expression. *Pain Med.* **2015**, *16*, 1993–1999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Campillo-Navarro, M.; Leyva-Paredes, K.; Donis-Maturano, L.; Rodríguez-López, G.M.; Soria-Castro, R.; García-Pérez, B.E.; Puebla-Osorio, N.; Ullrich, S.E.; Luna-Herrera, J.; Flores-Romo, L.; et al. Mycobacterium tuberculosis catalase inhibits the formation of mast cell extracellular traps. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. von Köckritz-Blickwede, M.; Goldmann, O.; Thulin, P.; Heinemann, K.; Norrby-Teglund, A.; Rohde, M.; Medina, E. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* **2008**, *111*, 3070–3080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Gonzalez-Espinosa, C.; Madera-Salcedo, I.K.; Molina-Martínez, L.M.; Martínez-Cuevas, F.L. *Opioids and the Immune System*; Cruz, O.S., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022; pp. 249–285. [[CrossRef](#)]
31. Franchi, S.; Moschetti, G.; Amodeo, G.; Sacerdote, P. Do All Opioid Drugs Share the Same Immunomodulatory Properties? A Review From Animal and Human Studies. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2914. [[CrossRef](#)]
32. Gabr, M.M.; Saeed, I.; Miles, J.A.; Ross, B.P.; Shaw, P.N.; Hollmann, M.W.; Parat, M.-O. Interaction of opioids with tlr4—Mechanisms and ramifications. *Cancers* **2021**, *13*, 5274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Watkins, L.R.; Hutchinson, M.R.; Rice, K.C.; Maier, S.F. The “Toll” of Opioid-Induced Glial Activation: Improving the Clinical Efficacy of Opioids by Targeting Glia. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 581–591. [[CrossRef](#)]
34. Friesen, C.; Roscher, M.; Hormann, I.; Fichtner, I.; Alt, A.; Hilger, R.A.; Debatin, K.-M.; Miltner, E. Cell death sensitization of leukemia cells by opioid receptor activation. *Oncotarget* **2013**, *4*, 677–690. [[CrossRef](#)]
35. Friesen, C.; Roscher, M.; Alt, A.; Miltner, E. Methadone, commonly used as maintenance medication for outpatient treatment of opioid dependence, kills leukemia cells and overcomes chemoresistance. *Cancer Res* **2008**, *68*, 6059–6064. [[CrossRef](#)]
36. Singh, A.; Jayanthan, A.; Farran, A.; Elwi, A.N.; Kim, S.-W.; Farran, P.; Narendran, A. Induction of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells by the therapeutic opioid methadone and effective synergy with Bcl-2 inhibition. *Leuk. Res.* **2011**, *35*, 1649–1657. [[CrossRef](#)]
37. Hu, S.; Sheng, W.S.; Lokensgard, J.R.; Peterson, P.K. Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacology* **2002**, *42*, 829–836. [[CrossRef](#)]
38. McCoy, M.T.; Jayanthi, S.; Cadet, J.L. Potassium channels and their potential roles in substance use disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1249. [[CrossRef](#)]
39. Züнкler, B.J.; Wos-Maganga, M. Comparison of the effects of methadone and heroin on human ether-à-go-go-related gene channels. *Cardiovasc. Toxicol.* **2010**, *10*, 161–165. [[CrossRef](#)]
40. Eap, C.B.; Crettol, S.; Rougier, J.-S.; Schläpfer, J.; Grilo, L.S.; Déglon, J.-J.; Besson, J.; Croquette-Krokar, M.; Carrupt, P.-A.; Abriel, H. Stereoselective block of hERG channel by (S)-methadone and QT interval prolongation in CYP2B6 slow metabolizers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *81*, 719–728. [[CrossRef](#)]

41. Pourhassanali, N.; Zarbakhsh, S.; Miladi-Gorji, H. Morphine dependence and withdrawal-induced changes in mouse Sertoli cell (TM4) line: Evaluation of apoptotic, inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Reprod. Toxicol.* **2021**, *105*, 175–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zamani, N.; Osgoei, L.T.; Aliaghaei, A.; Zamani, N.; Hassanian-Moghaddam, H. Chronic exposure to methadone induces activated microglia and astrocyte and cell death in the cerebellum of adult male rats. *Metab. Brain Dis.* **2023**, *38*, 323–338. [[CrossRef](#)]
43. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532–1535. [[CrossRef](#)]
44. Wang, Y.; Li, M.; Stadler, S.; Correll, S.; Li, P.; Wang, D.; Hayama, R.; Leonelli, L.; Han, H.; Grigoryev, S.A.; et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* **2009**, *184*, 205–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pilszczek, F.H.; Salina, D.; Poon, K.K.H.; Fahey, C.; Yipp, B.G.; Sibley, C.D.; Robbins, S.M.; Green, F.H.Y.; Surette, M.G.; Sugai, M.; et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 7413–7425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Saha, P.; Yeoh, B.S.; Xiao, X.; Golonka, R.M.; Singh, V.; Wang, Y.; Vijay-Kumar, M. PAD4-dependent NETs generation are indispensable for intestinal clearance of *Citrobacter rodentium*. *Mucosal Immunol.* **2019**, *12*, 761–771. [[CrossRef](#)]
47. Hidalgo, A.; Libby, P.; Soehnlein, O.; Aramburu, I.V.; Papayannopoulos, V.; Silvestre-Roig, C. Neutrophil extracellular traps: From physiology to pathology. *Cardiovasc. Res.* **2022**, *118*, 2737–2753. [[CrossRef](#)]
48. Chen, T.; Li, Y.; Sun, R.; Hu, H.; Liu, Y.; Herrmann, M.; Zhao, Y.; Muñoz, L.E. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 775267. [[CrossRef](#)]
49. Agrawal, I.; Sharma, N.; Saxena, S.; Arvind, S.; Chakraborty, D.; Chakraborty, D.B.; Jha, D.; Ghatak, S.; Epari, S.; Gupta, T.; et al. Dopamine induces functional extracellular traps in microglia. *iScience* **2021**, *24*, 101968. [[CrossRef](#)]
50. Celik, M.; Labuz, D.; Henning, K.; Busch-Dienstfertig, M.; Gaveriaux-Ruff, C.; Kieffer, B.L.; Zimmer, A.; Machelska, H. Leukocyte opioid receptors mediate analgesia via Ca²⁺-regulated release of opioid peptides. *Brain Behav. Immun.* **2016**, *57*, 227–242. [[CrossRef](#)]
51. Petry, A.; Görlach, A. Regulation of NADPH Oxidases by G Protein-Coupled Receptors. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *30*, 74–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gaveriaux-Ruff, C.; Matthes, H.W.D.; Peluso, J.; Kieffer, B.L. Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the μ -opioid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6326–6330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Nagata, K.; Nagase, H.; Okuzumi, A.; Nishiyama, C. Delta Opioid Receptor Agonists Ameliorate Colonic Inflammation by Modulating Immune Responses. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 730706. [[CrossRef](#)]
54. Wang, X.; Loram, L.C.; Ramos, K.; de Jesus, A.J.; Thomas, J.; Cheng, K.; Reddy, A.; Somogyi, A.A.; Hutchinson, M.R.; Watkins, L.R.; et al. Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6325–6330. [[CrossRef](#)]
55. Hutchinson, M.R.; Shavit, Y.; Grace, P.M.; Rice, K.C.; Maier, S.F.; Watkins, L.R. Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: An integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 772–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hutchinson, M.R.; Coats, B.D.; Lewis, S.S.; Zhang, Y.; Sprunger, D.B.; Rezvani, N.; Baker, E.M.; Jekich, B.M.; Wieseler, J.L.; Somogyi, A.A.; et al. Proinflammatory cytokines oppose opioid-induced acute and chronic analgesia. *Brain Behav. Immun.* **2008**, *22*, 1178–1189. [[CrossRef](#)]
57. Stevens, C.; Aravind, S.; Das, S.; Davis, R. Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 1421–1429. [[CrossRef](#)]
58. Chang, L.; Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **2001**, *410*, 37–40. [[CrossRef](#)]
59. Zhang, P.; Yang, M.; Chen, C.; Liu, L.; Wei, X.; Zeng, S. Toll-Like Receptor 4 (TLR4)/Opioid Receptor Pathway Crosstalk and Impact on Opioid Analgesia, Immune Function, and Gastrointestinal Motility. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1455. [[CrossRef](#)]
60. Cuitavi, J.; Torres-Pérez, J.V.; Lorente, J.D.; Campos-Jurado, Y.; Andrés-Herrera, P.; Polache, A.; Agustín-Pavón, C.; Hipólito, L. Crosstalk between Mu-Opioid receptors and neuroinflammation: Consequences for drug addiction and pain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2023**, *145*, 105011. [[CrossRef](#)]
61. Rallabhandi, P.; Nhu, Q.M.; Toshchakov, V.Y.; Piao, W.; Medvedev, A.E.; Hollenberg, M.D.; Fasano, A.; Vogel, S.N. Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: A novel paradigm for receptor cooperativity. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 24314–24325. [[CrossRef](#)]
62. Bucci, M.; Vellecco, V.; Harrington, L.; Brancaleone, V.; Roviezzo, F.; Raso, G.M.; Ianaro, A.; Lungarella, G.; De Palma, R.; Meli, R.; et al. Crosstalk between toll-like receptor 4 (TLR4) and proteinase-activated receptor 2 (PAR₂) is involved in vascular function. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 411–420. [[CrossRef](#)]
63. du Sert, N.P.; Hurst, V.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M.T.; Baker, M.; Browne, W.J.; Clark, A.; Cuthill, I.C.; Dirnagl, U.; et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000410. [[CrossRef](#)]

64. Perez-Alvarez, S.; Iglesias-Guimaraes, V.; Solesio, M.E.; de Mera, R.M.M.-F.; Yuste, V.J.; Galindo, M.F.; Jordán, J. Methadone induces CAD degradation and AIF-mediated necrotic-like cell death in neuroblastoma cells. *Pharmacol. Res.* **2011**, *63*, 352–360. [[CrossRef](#)]
65. Gryniewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R.Y. New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440–3450. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.