

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

La guineensina aumenta la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos M1 activados y ejerce efectos inhibidores sobre los macrófagos en reposo y los macrófagos M2

Guineensine increases the production of pro-inflammatory cytokines in activated M1 macrophages and shows inhibitory effects on resting and M2 macrophages

Authors/Autores: Jiménez, M., Viveros-Paredes, J.M., Vázquez-Urrutia, J.R., Solorzano-Ibarra, F., Téllez-Bañuelos, M.C., Haramati, J., Ortiz-Lazareno, P.C.

ID: e1886

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1886>

Received/Fecha de recepción: January 17th 2025

Accepted /Fecha de aceptación: January 14th 2026

Available online/Fecha de publicación: February 23th 2026

Please cite this article as/Como citar este artículo: Jiménez, M., Viveros-Paredes, J.M., Vázquez-Urrutia, J.R., Solorzano-Ibarra, F., Téllez-Bañuelos, M.C., Haramati, J., Ortiz-Lazareno, P.C. (2026). Guineensine increases the production of pro-inflammatory cytokines in activated M1 macrophages and shows inhibitory effects on resting and M2 macrophages. *Revista Bio Ciencias*, 13, e1886. <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1886>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

La guineensina aumenta la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos M1 activados y ejerce efectos inhibidores sobre los macrófagos en reposo y los macrófagos M2

Guineensine increases the production of pro-inflammatory cytokines in activated M1 macrophages and shows inhibitory effects on resting and M2 macrophages

Efecto de la guineensina en macrófagos activados M1 y M2/

Effect of guinenessin on activated M1 and M2 macrophages

Jiménez, M.¹ () <https://orcid.org/0000-0002-7532-5614>), Viveros-Paredes, J.M.² () <https://orcid.org/0000-0001-9211-8572>), Vázquez-Urrutia, J.R.³ () <https://orcid.org/0000-0002-4675-2203>), Téllez-Bañuelos, M.C.⁵ () <https://orcid.org/0000-0002-9057-1397>), Haramati, J.⁵ () <https://orcid.org/0000-0003-1952-1431>), Ortiz-Lazareno, P.C.^{6*} () <https://orcid.org/0000-0001-9045-7052>)

¹Departamento de Microbiología Centro de Ciencias Básicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Universidad # 940, Ciudad Universitaria, C.P. 20100, Aguascalientes, México

²Laboratorio de Investigación y Desarrollo Farmacéutico, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán #1421, C.P. 44430 Guadalajara, Jalisco, México.

³Department of Medicine, The Pennsylvania State University College of Medicine, The Pennsylvania State University, Hershey, PA 17033, USA.

⁴Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico-Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada #950, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México.

⁵ Departamento de Biología Celular y Molecular. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara, Cam. Ramón Padilla Sánchez #2100, Las Agujas, C.P. 44600, Zapopan, Jalisco, México.

⁶ División de Inmunología, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Sierra Mojada # 800, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México.

*Corresponding Author:

[Pablo Cesar Ortiz-Lazareno](#). División de Inmunología, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Sierra Mojada # 800, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México. Teléfono: 33 3618 9410. E-mail: pablolazareno@gmail.com

RESUMEN

La guineensina, un compuesto natural de la planta del pimiento, es un inhibidor de la recaptación de endocannabinoides y un posible agonista indirecto del receptor CB1

(CB1R). Si bien sus efectos cannabimiméticos se basan en la inhibición de la recaptación celular de AEA (N-araquidonoiletanolamida) y 2-AG (2-araquidonoilglicerol), su papel en la inflamación y la activación de macrófagos aún no se comprende completamente. Utilizando la línea celular humana similar a macrófagos THP-1, investigamos el efecto de la guineensina. Nuestros resultados muestran que cuando las células se estimulan con lipopolisacárido (LPS) e IFN- γ (activación de M1), la guineensina aumenta la producción de IL-1 β , TNF- α y proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), aumentando estas dos últimas hasta 2.5 veces. Por el contrario, la guineensina redujo significativamente los niveles de MCP-1 e IL-8 tanto en macrófagos en reposo como en aquellos estimulados con IL-4 e IL-13 (activación de M2). Cabe destacar que la guineensina no afectó significativamente la fagocitosis ni la producción de ROS en macrófagos activados. Estos hallazgos sugieren que la guineensina modula de forma diferencial la respuesta inmunitaria en macrófagos M1, M2 y en reposo.

PALABRAS CLAVE:

Guineensina, Inflamación, Citocinas, Macrófagos.

ABSTRACT

Guineensine, a natural compound from pepper plants, is an endocannabinoid uptake inhibitor and a potential indirect CB1 receptor (CB1R) agonist. While its cannabimimetic effects are established through inhibition of AEA (N-arachidonoyl ethanolamide) and 2-AG (2-arachidonoylglycerol) cellular uptake, its role in inflammation and macrophage activation remains unclear. Using the human THP-1 macrophage-like cell line, we investigated the effects of guineensine. Our results showed that when cells are stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and IFN- γ (M1 activation), guineensine increased the production of IL-1 β , TNF- α , and monocyte chemoattractant protein (MCP-1), with the latter two increasing up to 2.5-fold. Conversely, guineensine significantly decreased MCP-1 and IL-8 levels in both resting macrophages and those stimulated with IL-4 and IL-13 (M2 activation). Notably, guineensine did not significantly affect phagocytosis or respiratory burst (ROS production) in activated macrophages. These findings suggest that guineensine differentially modulates the immune response in M1, M2, and resting macrophages.

KEY WORDS

Guineensine, Inflammation, Cytokines, Macrophages.

Introducción

La guineensina es una molécula derivada de un ácido graso y conjugada a un anillo aromático mediante una cadena de seis carbonos (Okogun & Ekong, 1974). Esta molécula es aislada de varias especies del género de plantas *Piper*, como *P.*

guineense Schumach, *P. longum* y *P. nigrum*, denominadas comúnmente como pimienta negra. La pimienta negra es la reina de las especias a nivel mundial, y además de utilizarse seca, el extracto acuoso de pimienta negra se emplea ampliamente en la medicina ayurvédica debido a la extensa actividad biológica atribuida a los diferentes componentes del fruto (Singh *et al.*, 2004). Entre los componentes de las semillas de pimienta negra, la guineensina es el cuarto compuesto más abundante.

La guineensina ejerce diferentes efectos biológicos, entre ellos, inhibe la actividad de las enzimas alfa-glucosidasa-I (Pullela *et al.*, 2006) y colesterol aciltransferasa (Lee *et al.*, 2004). Un estudio reciente (*in vivo*) observó que la guineensina induce efectos cannabimiméticos dosis-dependientes (hipomotilidad, hipotermia, antinocicepción y catalepsia) (Nicolussi *et al.*, 2014). Los autores de este estudio sugieren que la guineensina podría actuar como un agonista indirecto del receptor CB1 (CB1R). Sus resultados demostraron que la guineensina es un inhibidor de la captación celular de endocannabinoides, independiente de la hidrolasa de amida de ácidos grasos (FAAH) o la lipasa de monoacilglicerol (MAGL). Este efecto fue más evidente en la captación de anandamida (AEA) en células U937 ($EC_{50} = 290$ nM) y células HMC-1 ($EC_{50} = 617$ nM) (Nicolussi *et al.*, 2014). Además, este estudio también demostró que la administración de guineensina reduce la producción de citocinas proinflamatorias durante la endotoxemia inducida por LPS en un modelo murino de inflamación aguda. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la guineensina podría ser un agente terapéutico prometedor para controlar los efectos inflamatorios y el dolor. Sin embargo, se desconoce el papel de la guineensina en las primeras células implicadas en la inflamación y las respuestas inmunitarias.

El sistema fagocítico mononuclear (MPS) es fundamental para el desarrollo de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. El SFM está conformado por monocitos, macrófagos y células dendríticas (DC). En particular, los monocitos y los macrófagos son cruciales para iniciar y resolver la inflamación inducida por patógenos o el daño tisular. Los monocitos son leucocitos de la sangre periférica que, además de ser un reservorio de macrófagos y DC, presentan actividad fagocítica y producen especies reactivas de oxígeno y citocinas inflamatorias en respuesta a diversos estímulos, como productos bacterianos exógenos, lipopolisacáridos (LPS) y citocinas endógenas (Silva *et al.*, 2018). Además, se ha observado que la unión de los factores hematopoyéticos GM-CSF e IL-3 a sus receptores heterodiméricos, formados por la subunidad beta común y la subunidad alfa específica (CD116 o CD123, respectivamente), es un potente factor para la diferenciación de monocitos en macrófagos (Tarique *et al.*, 2015) y potencia la producción de TNF- α inducida por LPS en monocitos (Borriello *et al.*, 2017). Se ha observado una mayor respuesta a GM-CSF dado que CD116 se expresa constitutivamente, mientras que CD123 no. Sin embargo, se ha observado que la expresión basal de CD123 aumenta tras el cocultivo con IL-4 (Borriello *et al.*, 2015). Esta activación por citocinas pone de manifiesto el papel que pueden desempeñar los monocitos en el inicio de la respuesta inflamatoria a diversos estímulos agresores.

Los macrófagos son células residentes en los tejidos, derivadas de precursores embrionarios o monocitos de sangre periférica. Estas células desempeñan una amplia gama de funciones, desde la eliminación de patógenos y células apoptóticas hasta el mantenimiento de la homeostasis, la angiogénesis, la reparación tisular y el

control de la progresión tumoral, todo ello en respuesta a diversas señales ambientales (Silva *et al.*, 2018). Existen dos tipos principales de macrófagos activados: M1 y M2. Los macrófagos M1, también conocidos como macrófagos clásicamente activados, se activan por un microambiente inflamatorio, típicamente mediado por LPS e interferón (IFN)- γ , pero también por GM-CSF y TNF- α ; estas células son proinflamatorias, tumorocidas, bactericidas y están asociadas a la presentación de antígenos y la eliminación de patógenos intracelulares. Los macrófagos M2, incluidos los macrófagos inmunorreguladores asociados a tumores, se activan mediante IL-4 e IL-13 (o TGF- β , IL-10 u otros factores asociados a tumores) y se relacionan con la promoción tumoral, la inmunorregulación, la remodelación tisular y las respuestas antiinflamatorias (Tarique *et al.*, 2015). Con respecto a la producción de citocinas, los M1 activados se caracterizan por la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN de tipo I, MCP-1 e IL-8. Por otro lado, la producción de IL-10, IL-4, IL-1RA y TGF- β se asocia principalmente a los M2 activados. Numerosos estudios han demostrado la función de estos dos subtipos de macrófagos en las vías inflamatorias, y su papel parece determinar el curso de la señalización inflamatoria y la progresión de la enfermedad (Saqib *et al.*, 2018). Por consiguiente, este artículo se centra en la importancia de analizar el efecto de la guineensina sobre la síntesis de citocinas y la función de los macrófagos en reposo o activados.

Material y Métodos

Obtención y preparación del extracto de guineensina

La Guineensina (≥ 95 % pureza en HPLC) fue aislada de los frutos secos de *P. nigrum* L. (obtenida de Delaca AG, Suiza). Para el aislamiento de la guineensina, los frutos pulverizados (1.05 kg) fueron sometidos a una extracción usando n-hexano, CHCl_3 y CH_3OH . El compuesto obtenido se caracterizó e identificó mediante espectroscopia de RMN multidimensional y espectrometría de masas, como se describió previamente por Nicolussi *et al.* Por último, se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver la guineensina (Nicolussi *et al.*, 2014).

Cultivo celular y diferenciación de la línea celular THP-1

Los monocitos humanos THP-1 se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (Cat. TIB-202, organismo: *Homo sapiens*; enfermedad: leucemia monocítica aguda; tipo celular: monocito). Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10 % (inactivado por calor), 2 mM de L-glutamina, 20 μM de β -mercaptopropionato, 100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomycin (medio RPMI completo). Los cultivos fueron incubados a 37 °C con 5 % de CO_2 y 95 % de humedad relativa. Se realizaron subcultivos cada 3 días mediante resuspensión a una densidad de 2×10^5 células viables/mL en medio completo fresco. Las células THP-1 se sembraron a una concentración de 1×10^6 células/mL en placas de cultivo de 12 pocillos y se trataron con 200 nM de éster de forbol miristato acetato (PMA; Sigma-Aldrich) durante 72 horas para inducir su diferenciación a macrófagos. Tras el tratamiento con PMA, las células se lavaron dos veces con solución (estéril) salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.2) para eliminar cualquier resto de PMA y se incubaron en medio completo fresco durante 24 horas antes del experimento.

Producción de citocinas por células THP1

Los macrófagos THP-1 en reposo se pretrataron con guineensina a concentraciones de 290 nM o 1000 nM durante 30 min. Tras el pretratamiento, las células se estimularon durante 24 horas para inducir su polarización a: Macrófagos M1: Estimulados con 100 ng/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN- γ ; Macrófagos M2: Estimulados con 20 ng/mL de IL-4 y 20 ng/mL de IL-13; Control no estimulado: Sin tratamiento adicional. Este protocolo de polarización es una técnica clásica para inducir la diferenciación de macrófagos, como se describió previamente (Mantovani *et al.*, 2004). Tras el periodo de estimulación de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes celulares y se lavaron con PBS y centrifugaron a 635 xg durante 10 minutos. Las concentraciones de IL-1 β , TNF- α , IL-12, MCP-1/CCL-2 e IL-8 se cuantificaron mediante el sistema *LEGENDplex*[™] (BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.). La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo *Attune Acoustic Focusing* (Life Technologies) y el análisis se llevó a cabo con el software de análisis de datos *LEGENDplex*[™] (BioLegend). Se adquirieron un total de 300 eventos de microesferas por cada tipo de citocina, según las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresan como concentración en pg/mL.

Ensayo de fagocitosis

Los macrófagos THP-1 en reposo se trataron con guineensina a concentraciones de 290 nM o 1000 nM durante 24 horas. Tras el tratamiento, las células se cosecharon utilizando Accutase durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, las células se incubaron con 0.5 mg/mL de una suspensión de conjugado de biopartículas de *E. coli* pHrodo Green (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 2 horas a 37 °C. Se incluyeron las siguientes condiciones como controles experimentales: Blanco (sin tinción): células sin bacterias; Control basal (CB): células incubadas con bacterias, pero sin tratamiento con guineensina; Control negativo (NC): células pretratadas con paraformaldehído al 4 % e incubadas a 4 °C para inhibir la fagocitosis.

La internalización bacteriana se cuantificó midiendo la intensidad media de fluorescencia (MFI). Se utilizó un citómetro de enfoque acústico *Attune* (Life Technologies) para realizar las mediciones. Se adquirieron 20 000 eventos dentro de la región de células. Se utilizó la media geométrica para calcular la IMF. Los datos se analizaron con el software FlowJo v10.0.7. La fagocitosis relativa se calculó usando la siguiente fórmula: (MFI de células experimentales-MFI de células B) / (MFI de células CB-MFI de células B) X 100 %.

Determinación de especies reactivas de oxígeno

La generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) se cuantificó usando la sonda fluorogénica *CellROX Green* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los macrófagos THP-1 se trataron, cosecharon y lavaron como en el protocolo descrito para el ensayo de fagocitosis. Tras el tratamiento, las células se incubaron con 200 μ M de hidroperóxido de terc-butilo (TBHP) durante 1 hora para inducir estrés oxidativo (control positivo). Posteriormente, se incubaron con 0.5 μ M del reactivo *CellROX Green* durante una hora adicional a 37 °C. Se realizó una tinción con SYTOX

Red (1 nM) para determinar la viabilidad celular. La producción intracelular de ROS se midió mediante citometría de flujo y los datos se adquirieron en el citómetro de flujo *Attune Acoustic Focusing* (Life Technologies). Un total de 20 000 eventos fueron adquiridos por muestra de la región de células. La intensidad media de fluorescencia (MFI) se calculó usando la media geométrica y los datos se analizaron con el software FlowJo v10.0.7.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media $\pm$ desviación estándar (SD) de cuatro experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples o la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones con la condición basal. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados y Discusión

La guineensina moduló los niveles de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de macrófagos THP-1 no estimulados.

El efecto de la guineensina (290 nM y 1000 nM) sobre la síntesis de citocinas fue evaluado en macrófagos THP-1. Las células se estimularon con LPS+IFN- γ o IL-4+IL-13, y se utilizaron células no estimuladas como grupo control (Figura 1).

El tratamiento con guineensina disminuyó significativamente la secreción de MCP-1 e IL-8 por parte de los macrófagos THP-1. Los niveles de MCP-1 se redujeron en un 80 % al usar una concentración de 290 nM de guineensina ($2711,36 \pm 274$ pg /mL) y en un 68 % cuando se usaron 1000 nM de guineensina ($4376,54 \pm 19,19$ pg /mL), en comparación con el control no tratado ($13665,3 \pm 163,9$ pg /mL). De manera similar, la secreción de IL-8 disminuyó en un 78 % y un 57 % tras el estímulo con guineensina a concentraciones de 290 nM ($907,98 \pm 12,59$ pg /mL) y 1000 nM ($1794,94 \pm 80,43$ pg /mL), respectivamente, en relación con el control no tratado ($4122,87 \pm 182,6$ pg /mL).

Cuando se estimularon las células THP-1 con LPS + IFN- γ , el tratamiento con guineensina a 290 nM aumentó la liberación de citocinas proinflamatorias. Los niveles de IL-1 β y TNF- α aumentaron en un 54 % y un 78.6 %, respectivamente, en comparación con las células estimuladas, pero no tratadas. El efecto más pronunciado se observó en MCP-1, que mostró un aumento superior a 2.5 veces de cambio. En cambio, la secreción de IL-8 no se vio afectada significativamente tras la estimulación con guineensina a una concentración de 290 nM, pero disminuyó en un 45.6 % al usar la concentración de 1000 nM.

Cuando las células se estimularon con IL-4 + IL-13, la guineensina actuó sinérgicamente para inhibir aún más la liberación de MCP-1 e IL-8. El tratamiento con guineensina a una concentración de 290 nM inhibió la liberación de MCP-1 en un 69 % y la de IL-8 en un 51 % ($p < 0.005$), en comparación con el control estimulado, pero

no tratado. Este efecto inhibitorio fue dosis-dependiente, ya que se observó que la guineensina a una concentración de 1000 nM, disminuye aún más los niveles de MCP-1 e IL-8 en un 80 % y un 84 %, respectivamente.

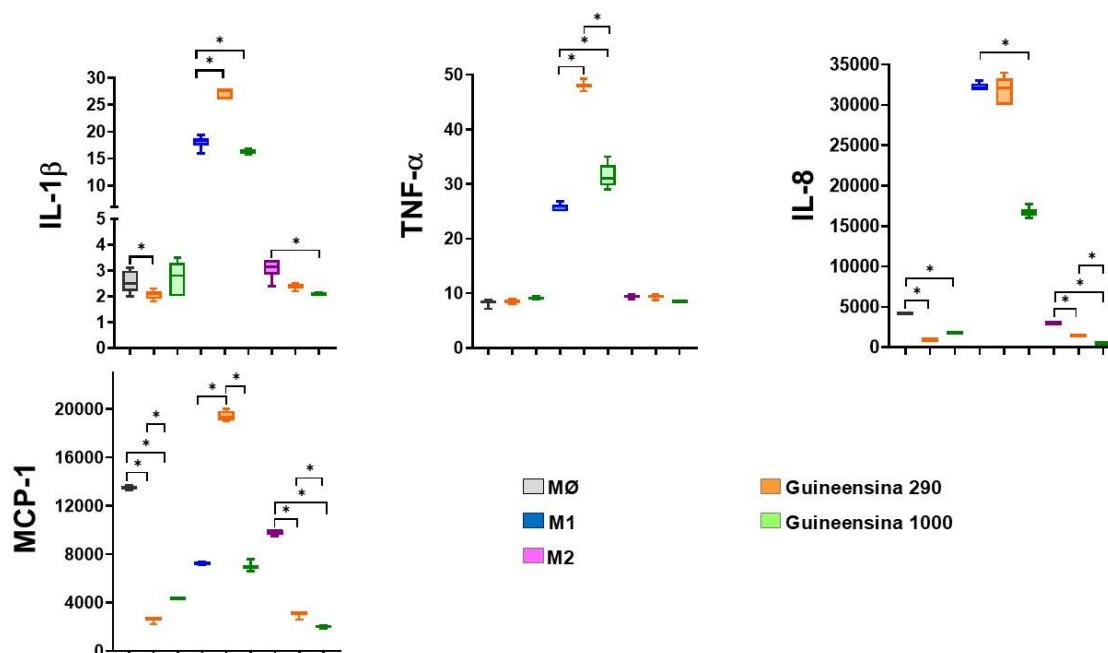


Figura 1. Secreción de citocinas proinflamatorias por células THP1 diferenciadas a macrófagos, tratadas o no con guineensina y no estimuladas (MØ), o estimuladas con LPS + IFN- γ (M1), o IL-4 + IL-13 (M2). LPS: lipopolisacárido; IFN- γ : interferón gamma; IL: interleucina; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos -1. * $p < 0,005$. Los datos se presentan como la media $\pm$ desviación estándar (SD) de cuatro experimentos independientes.

La guineensina no afecta la actividad fagocítica de los macrófagos.

Para determinar cómo la guineensina influye en la actividad fagocítica de los macrófagos, utilizamos Biopartículas de *E. coli* pHRedo Green. Al exponerse a paraformaldehído en hielo, la actividad fagocítica de las células se redujo a la mitad en comparación con el grupo control. Sin embargo, la actividad fagocítica de las células tratadas con guineensina a 290 nM (51,07 %) o 1000 nM (46,5 %) fue similar a la presentada por los macrófagos THP-1 no estimulados con guineensina (42,07 %) (Figura 2).

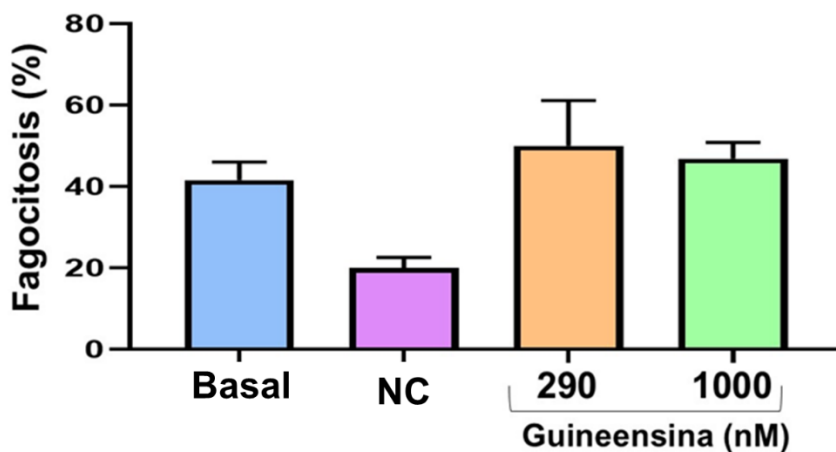


Figura 2. Efecto de la guineensina sobre la actividad fagocítica de células THP-1 diferenciadas en macrófagos. El paraformaldehído sobre hielo se usó como control de la inhibición de la fagocitosis. También se utilizó un control negativo (NC). Los datos representan cuatro ensayos independientes. * $p < 0.005$.

La guineensina no afecta el estallido respiratorio de los macrófagos.

Posteriormente, se analizó el efecto de la guineensina sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en macrófagos THP-1 mediante la sonda fluorogénica *CellROX Green*. El estallido respiratorio se indujo con hidróperóxido de terc-butilo (TBHP). El tratamiento con guineensina a concentraciones de 290 nM o 1000 nM no afectó significativamente la producción de ROS ni alteró el estallido oxidativo inducido por TBHP (Figura 3).

En el presente estudio, observamos que la guineensina modula la secreción de varias citocinas (MCP-1, IL-8, IL-1 β , TNF- α) en macrófagos humanos en reposo o estimulados, pero esta acción no afecta la funcionalidad celular. Esto es importante, ya que los macrófagos son células fundamentales en la eliminación de agentes patógenos.

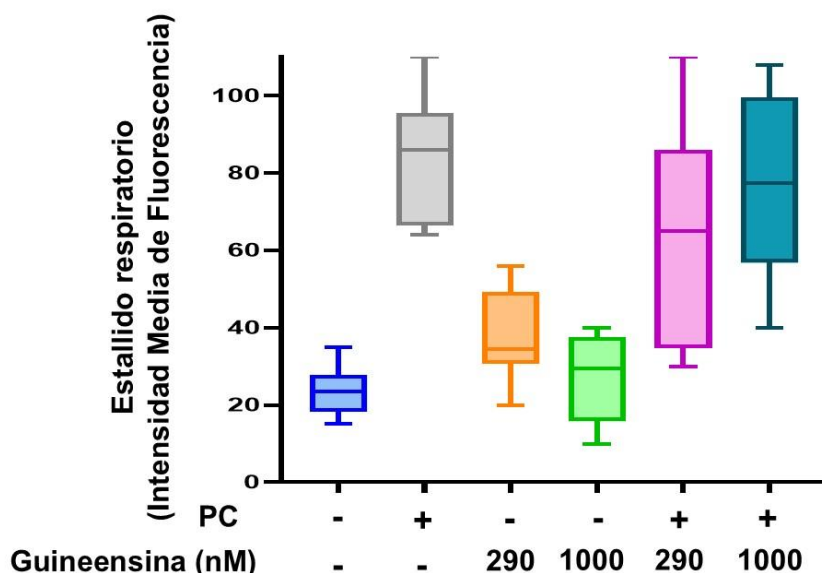


Figura 3. Efecto de la guineensina sobre la producción de ROS por células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Como control positivo, se utilizó (PC) TBHP. Los datos son representativos de cuatro ensayos independientes. * $p < 0.05$.

En otro estudio se concluyó que la guineensina es un potente inhibidor de la captación celular de AEA; su efecto se observó en células U937 con una EC50 de 290 nM (IC del 95 % = 190-437 nM) y en HMC-1 con una EC50 de 617 nM (IC del 95 % = 451-844 nM) (Nicolussi *et al.*, 2014). Además, se ha reportado que a 10 μ M, interactúa con el receptor δ , los receptores de serotonina 5-HT2A y 5-HT2B, y el transportador de dopamina (Reynoso-Moreno *et al.*, 2017). Por ello, decidimos evaluar el efecto de la N- isobutilamida a concentraciones de 290 nM y 1000 nM en células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Seleccionamos la segunda condición para evaluar el efecto fuera del rango de concentraciones en las que se ha demostrado que la guineensina inhibe la recaptación de endocannabinoides en las células estudiadas previamente. Nuestros resultados mostraron que la guineensina tiene efectos inmunomoduladores con respecto a la síntesis de citocinas proinflamatorias. En macrófagos en reposo, la guineensina indujo una reducción en la expresión de IL-8 y MCP-1, ambas quimiocinas importantes en el inicio de la respuesta inflamatoria. Se ha descrito que el PMA, un potente inductor de la diferenciación aumenta la expresión de CB1 e incrementa la proporción de transcritos CB1:CB2 de 1:17,5 a 1:3 en 5 días de cultivo (Han *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestras células se cultivaron solo durante 24 horas después de la diferenciación y se cultivaron con RPMI-S, un medio enriquecido con FBS al 10 %. Se sabe que el FBS contiene 2-AG en concentraciones biológicamente activas (250 a 700 nM) (Marazzi *et al.*, 2011). Esto podría ser una limitación del presente estudio, ya que el 2-AG es un agonista completo del receptor CB2 humano y un inhibidor de la acumulación de cAMP, lo que atenúa la producción de citocinas (Gonsiorek *et al.*, 2000; Sugiura *et al.*, 2000), efecto

que podría potenciarse al inhibir la captación celular de endocannabinoides. Curiosamente, observamos un mayor incremento de MCP-1 en macrófagos MØ que en aquellos estimulados con LPS + IFN- γ . Es importante destacar que esta quimiocina es secretada por monocitos, macrófagos y células dendríticas, y no por macrófagos M1. En este sentido, algunos estudios demostraron que las células THP1, U937 y los macrófagos primarios estimulados con IFN- γ + LPS inducen un fenotipo M1 con alta producción de IL-1, IL-18, RANTES, G-CSF, IFN- γ , GM-CSF e IL-2 sin cambios significativos en MCP-1 (Chimal-Ramírez *et al.*, 2016). En particular, en nuestro estudio observamos un aumento en los niveles de IL-1 β e IL-8 en macrófagos estimulados con LPS + IFN- γ en comparación con la diferenciación de macrófagos solo con PMA, lo que es consistente con estudios previos que analizan la producción de IL-1 β e IL-8 por macrófagos M1 (Murray *et al.*, 2014).

Además, cuando las células se estimulan con IL-4 + IL-13, el tratamiento con guineensina a 290 o 1000 nM maximiza la inhibición de la producción de IL-8 y MCP-1. Recientemente, se ha concluido que los macrófagos pulmonares humanos de tipo M2 producen más 2-AG que AEA en condiciones basales; además, la expresión de CB2 es mayor que la de CB1 (Staiano *et al.*, 2016). Por lo tanto, al igual que en los macrófagos en reposo, es probable que la activación de CB2 por 2-AG esté inhibiendo la síntesis de estas citocinas.

Por otro lado, la liberación de IL-1 β , TNF- α y MCP-1 por la activación con LPS+IFN- γ se potencia con la adición de guineensina a 290 nM. Sin embargo, a 1000 nM, la liberación de IL-8 disminuyó. Esto se debe probablemente a que la guineensina presenta una mayor actividad inhibidora de la captación celular de AEA. La producción de AEA se evaluó en un estudio con macrófagos murinos (J774 y macrófagos circulantes de rata) y resultó ser mayor que la de 2-AG. Se observó que la estimulación de macrófagos J774 con ionomicina o LPS induce un aumento de 2 y 7.8 veces en los niveles de 2-AG y AEA, respectivamente (Di Marzo *et al.*, 1999). Asimismo, la estimulación *in vitro* con LPS, con o sin IFN- γ , disminuye la expresión de CB2 en macrófagos (Carlisle *et al.*, 2002). Esto podría mejorar la unión de AEA a CB1. La activación de CB1 potencia la actividad proinflamatoria de los macrófagos mediante la activación de p38-MAPK, lo que incrementa la producción de TNF- α y MCP-1 (Han *et al.*, 2009). Además, se ha descrito que la señalización de 2-AG a través de CB2 induce una mayor producción de IL-8 y MCP-1 en células HL60 (Kishimoto *et al.*, 2004).

Nuestros resultados concuerdan con los de otros estudios que evalúan los efectos del CBD en la respuesta inflamatoria de los macrófagos (Muthumalage & Rahman, 2019; Yeisley *et al.*, 2021). En un estudio, los macrófagos se expusieron a diferentes concentraciones de CBD, lo que mostró un perfil antiinflamatorio al reducir los niveles de IL-8 inducida por LPS, de forma similar a los hallazgos de este estudio con guineensina a 1000 nM (Muthumalage & Rahman, 2019). Asimismo, otro estudio mostró una reducción en los niveles de IL-1 β , TNF- α e IL-6 tras la administración de CBD (Yeisley *et al.*, 2021).

Curiosamente, a pesar de la modulación en la síntesis de citocinas por las células THP-1, no se observaron efectos significativos en la funcionalidad de estas células. Se ha descrito que la activación de CB1 mediante AEA induce directamente la generación intracelular de ROS (Han *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que la

activación de los receptores CBD disminuye los niveles de p-mTOR S2448 fosforilado y NOS-3, con un aumento de COX-2, lo que indica la inducción de estrés oxidativo y autofagia (Yeisley *et al.*, 2021). Por otro lado, se ha demostrado que la señalización de 2-AG a través de CB2 aumenta la fagocitosis de zimosán mediada por dectina-1, pero no la de *E. coli*, *S. aureus*, células apoptóticas o microesferas de látex (Shiratsuchi *et al.*, 2008). Estudios más recientes también indican que la AEA potencia la fagocitosis a través de CB1 mediante la vía de señalización $G_{(α) i/o}$ /RhoA/ROCK, aunque este efecto se anula a altas concentraciones (Mai *et al.*, 2015).

Los resultados de estos experimentos demuestran que la guineensina modula la respuesta inflamatoria de monocitos/macrófagos de manera dependiente del estado de activación de los macrófagos, observándose efectos diferenciales en macrófagos M1, M2 y en reposo. A la luz de estos hallazgos, futuros estudios deberían investigar el efecto de la guineensina en otras células inmunitarias implicadas en la inflamación y las respuestas inmunitarias, como las células dendríticas. Una limitación importante del presente estudio es que es *in vitro*; por lo cual, se requiere más investigación para evaluar los efectos de la guineensina en modelos animales. Dichos estudios *in vivo* podrían centrarse en el potencial terapéutico de esta molécula, en afecciones como la sepsis, la translocación bacteriana y el dolor.

Conclusiones

Nuestro estudio demuestra que la N- isobutilamida guineensina modula la producción de citocinas en macrófagos THP-1 sin afectar su capacidad funcional de fagocitosis ni su estallido respiratorio en presencia de antígenos bacterianos. Observamos que una dosis intermedia de guineensina incrementó la producción de citocinas proinflamatorias, específicamente IL-1 β y TNF- α , en macrófagos activados M1. En contraste, la guineensina inhibió la secreción de IL-8 y MCP-1 tanto en macrófagos en reposo como en macrófagos polarizados M2.

Contribución de los autores

MJ. - Conceptualización, metodología, análisis formal, redacción del borrador original. JMVP. - Conceptualización, validación, redacción, revisión y edición. JRVU. - Metodología, revisión y edición. FS I. - Análisis formal, redacción, revisión y edición. M CTB. - Análisis formal, redacción, revisión y edición. JH. - Análisis formal, redacción, revisión y edición. PCOL. - Conceptualización, metodología, redacción del borrador original, administración del proyecto.

Financiamiento

Este trabajo fue apoyado por una beca CONACYT 266764 y el CUCEI- UdG PROSNI2017.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Vida Rosas González y al Dr. Salvador González Ochoa por su asistencia y apoyo.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Borriello, F., Iannone, R., Di Somma, S., Loffredo, S., Scamardella, E., Galdiero, M. R., Varricchi, G., Granata, F., Portella, G., & Marone, G. (2017). GM-CSF and IL-3 Modulate Human Monocyte TNF- α Production and Renewal in In Vitro Models of Trained Immunity. *Frontiers in Immunology*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00680>
- Borriello, F., Longo, M., Spinelli, R., Pecoraro, A., Granata, F., Staiano, R. I., Loffredo, S., Spadaro, G., Beguinot, F., Schroeder, J., & Marone, G. (2015). IL-3 synergises with basophil-derived IL-4 and IL-13 to promote the alternative activation of human monocytes. *European Journal of Immunology*, 45(7), 2042–2051. <https://doi.org/10.1002/eji.201445303>
- Carlisle, S. J., Marciano-Cabral, F., Staab, A., Ludwick, C., & Cabral, G. A. (2002). Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *International Immunopharmacology*, 2(1), 69–82. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00147-3)
- Chimal-Ramírez, G. K., Espinoza-Sánchez, N. A., Chávez-Sánchez, L., Arriaga-Pizano, L., & Fuentes-Pananá, E. M. (2016). Monocyte Differentiation towards Protumor Activity Does Not Correlate with M1 or M2 Phenotypes. *Journal of Immunology Research*, 2016(1), 1–16. <https://doi.org/10.1155/2016/6031486>
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Melck, D., Orlando, P., Wagner, J. A., & Kunos, G. (1999). Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *European Journal of Biochemistry*, 264(1), 258–267. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00631.x>
- Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D., & Hipkin, R. W. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Molecular Pharmacology*, 57(5), 1045–1050. [https://doi.org/10.1016/S0026-895X\(24\)26516-0](https://doi.org/10.1016/S0026-895X(24)26516-0)
- Han, K. H., Lim, S., Ryu, J., Lee, C. W., Kim, Y., Kang, J. H., Kang, S. S., Ahn, Y. K., Park, C. S., & Kim, J. J. (2009). CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages. *Cardiovascular Research*, 84(3), 378–386. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp240>

- Kishimoto, S., Kobayashi, Y., Oka, S., Gokoh, M., Waku, K., & Sugiura, T. (2004). 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells. *Journal of Biochemistry*, 135(4), 517–524. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh063>
- Lee, S. W., Rho, M. C., Nam, J. Y., Lim, E. H., Kwon, O. E., Kim, Y. H., Lee, H. S., & Kim, Y. K. (2004). Guineensine, an Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor, from the fruits of *Piper longum*. *Planta Medica*, 70(7), 678–679. <https://doi.org/10.1055/s-2004-827193>
- Mai, P., Tian, L., Yang, L., Wang, L., Yang, L., & Li, L. (2015). Cannabinoid receptor 1 but not 2 mediates macrophage phagocytosis by G(α)i/o/RhoA/ROCK signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 230(7), 1640–1650. <https://doi.org/10.1002/jcp.24911>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Marazzi, J., Kleyer, J., Paredes, J. M., & Gertsch, J. (2011). Endocannabinoid content in fetal bovine sera – unexpected effects on mononuclear cells and osteoclastogenesis. *Journal of Immunological Methods*, 373(1), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.08.021>
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., Sica, A., & Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Muthumalage, T., & Rahman, I. (2019). Cannabidiol differentially regulates basal and LPS-induced inflammatory responses in macrophages, lung epithelial cells, and fibroblasts. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 382(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114713>
- Nicolussi, S., Viveros-Paredes, J. M., Gachet, M. S., Rau, M., Flores-Soto, M. E., Blunder, M., & Gertsch, J. (2014). Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. *Pharmacological Research*, 80(1), 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.12.010>
- Okogun, J. I., & Ekong, D. E. U. (1974). Extracts from the fruits of *Piper guineense* Schum. and Thonn. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1(0), 2195–2198. <https://doi.org/10.1039/P19740002195>
- Pullela, S. V., Tiwari, A. K., Vanka, U. S., Vummenthula, A., Tatipaka, H. B., Dasari, K. R., Khan, I. A., & Janaswamy, M. R. (2006). HPLC-assisted chemobiological standardization of alpha-glucosidase-I enzyme inhibitory constituents from *Piper longum* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.06.004>

- Reynoso-Moreno, I., Najar-Guerrero, I., Escareño, N., Flores-Soto, M. E., Gertsch, J., & Viveros-Paredes, J. M. (2017). An Endocannabinoid Uptake Inhibitor from Black Pepper Exerts Pronounced Anti-Inflammatory Effects in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(43), 9435–9442. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02979>
- Saqib, U., Sarkar, S., Suk, K., Mohammad, O., Baig, M. S., & Savai, R. (2018). Phytochemicals as modulators of M1–M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget*, 9(25), 17937–17950. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24788>
- Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Yoshida, H., & Nakanishi, Y. (2008). Involvement of cannabinoid receptor CB2 in dectin-1-mediated macrophage phagocytosis. *Immunology and Cell Biology*, 86(2), 179–184. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100121>
- Silva, M., Videira, P. A., & Sackstein, R. (2018). E-Selectin Ligands in the Human Mononuclear Phagocyte System: Implications for Infection, Inflammation, and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01878>
- Singh, G., Marimuthu, P., Catalán, C. A., & de Lampasona, M. (2004). Chemical, antioxidant, and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1878–1884. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1863>
- Staiano, R. I., Loffredo, S., Borriello, F., Iannotti, F. A., Piscitelli, F., Orlando, P., Secondo, A., Granata, F., Lepore, M. T., Fiorelli, A., Varricchi, G., Santini, M., Triggiani, M., Di Marzo, V., & Marone, G. (2016). Human lung-resident macrophages express CB1 and CB2 receptors whose activation inhibits the release of angiogenic and lymphangiogenic factors. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(4), 531–540. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI1214-584R>
- Sugiura, T., Kondo, S., Kishimoto, S., Miyashita, T., Nakane, S., Kodaka, T., Suhara, Y., Takayama, H., & Waku, K. (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 605–612. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.605>
- Tarique, A. A., Logan, J., Thomas, E., Holt, P. G., Sly, P. D., & Fantino, E. (2015). Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(5), 676–688. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0012OC>
- Yeisley, D. J., Arabiyat, A. S., & Hahn, M. S. (2021). Cannabidiol-Driven Alterations to Inflammatory Protein Landscape of Lipopolysaccharide-Activated Macrophages In Vitro May Be Mediated by Autophagy and Oxidative Stress. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6(3), 253–263. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0109>

Graphical Abstract

