

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEINAS PEPT1 Y PPAR $\alpha$  EN  
INTESTINO DE UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN INTESTINAL  
BAJO EL ESTÍMULO DE ACEITE DE CANNABIS (*CANNABIS SATIVA L.*)  
DE AMPLIO ESPECTRO RICO EN CANNABIDIOL (CBD/AE).”**

**POR**  
**KEVIN ANTONIO CÁRDENAS NORIEGA**

**Como requisito parcial para obtener el grado de**  
**MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**

**JULIO 2021**

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEINAS PEPTI Y PPAR $\alpha$   
EN INTESTINO DE UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN  
INTESTINAL BAJO EL ESTÍMULO DE ACEITE DE  
CANNABIS (*Cannabis sativa* L.) DE AMPLIO  
ESPECTRO RICO EN CANNABIDIOL  
(CBD/AE).

**Comité de Tesis**



Dr. Uziel Castillo Velázquez.  
Presidente



Dr. Adolfo Solís Domínguez.  
Secretario



PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar.  
Vocal



Dra. Aracely García García.  
Vocal



Dr. Humberto Rodríguez Rocha.  
Vocal

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEINAS PEPT1 Y PPAR $\alpha$   
EN INTESTINO DE UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN  
INTESTINAL BAJO EL ESTÍMULO DE ACEITE DE  
CANNABIS (*Cannabis Sativa* L.) DE AMPLIO  
ESPECTRO RICO EN CANNABIDIOL  
(CBD/AE).

**Dirección de Tesis:**



Dr. Uziel Castillo Velázquez.  
Director



Dr. Adolfo Soto Domínguez.  
Co-Director



PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar.  
Co-Director



Dra. Aracely García García.  
Co-Director



Dr. Humberto Rodríguez Rocha.  
Co-Director

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto, para que pueda obtener el grado de Maestro en Ciencias.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme ser parte de su programa de posgrado.

A mi director de tesis: Dr. Uziel Castillo Velázquez, por todo el apoyo que me ha dado, además de la inmensa cantidad de conocimientos, la motivación a involucrarme desde mi servicio social en los proyectos, tenerme la confianza de otorgarme responsabilidades desde el inicio y podría decir que por su amistad también.

A mis asesores: Dr Adolfo Soto Domínguez, Dr. Humberto Rodríguez Rocha, Dra. Aracely García García y al Ph.D. Luis Edgar Rodríguez Tovar, por su paciencia, principalmente, y su disposición a ayudarme a mejorar como profesional.

A mis colegas en ICAN Vets: MVZ Mish Castillo y al Médico Erick Ponce, por su disposición a integrarme en ICAN y proporcionarme medios para mi investigación; y en conjunto a mis colegas MVZ Flor Ortiz, MVZ Ruy Vázquez por el apoyo y el trabajo en equipo que hemos desarrollado.

Al Laboratorio de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, sitios en donde llevé a cabo parte de mi investigación y siempre se me proporcionó de los medios necesarios para lograr mis objetivos.

A mis senpais MCA Laura Mar y MCA Alicia Herrera: también por su paciencia, pero sobre todo por su disposición a integrarme en sus proyectos, enseñarme y “tolerar” mis errores. Ser su perra me ayudó a formarme como profesional. También a la MVZ Fabiola Elizondo, que no fue mi senpai como tal pero igual contribuyó a mi formación.

A mis inmunoamigos: Jonás Barrera, Jennifer Anali, Argelia Holguin y Tafur Girón, hemos formado un peculiar equipo de trabajo con un increíble potencial a futuro, espero hagamos grandes cosas.

A mi familia: siempre me han apoyado y motivado a seguir adelante en lo que estoy haciendo y todo el amor y cariño que me han dado me ayudaron a seguir mis sueños.

A Edna: siempre me apoyó mucho en todo lo que hacía y siempre me ha deseado lo mejor en mi vida.

A mis amigos y colegas de la maestría: les agradezco a todos por su compañía y apoyo.

Finalmente a todos mis amigos y conocidos en esta vida que me apoyaron y sobre todo que permitieron que formara parte de sus vidas de algún modo.

## **DEDICATORIAS**

En primer lugar, a Dios, que si no fuera por su gracia yo no existiría, literalmente, y no me la podría pasar tan a gusto como me la paso en esta vida. Hare Krishna.

### **A mi familia:**

A mis padre, madre y hermanas, les dedico este esfuerzo que es hasta ahora ha sido de los más grandes en mi vida. En la sección de mi familia incluyo a esas personas que a pesar de no compartir lazos sanguíneos directos o si quiera cercanos, de alguna forma u otra me han ayudado a construir la persona que soy ahora.

### **A mis amigos:**

Todas esas personas que alguna vez se preocuparon por mí, mostraron interés en mi persona y apreciaron mi amistad.

### **A mi director de tesis y asesores:**

Esto no habría sido posible sin su apoyo, regaños, consejos y latigazos.

### **A mis enemigos:**

Siguen ladrando los perros, señal de que voy avanzando.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS. ....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN. ....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. <i>Cannabis sativa</i> L.....	3
2.1.1. Taxonomía y botánica. ....	3
2.1.2. Fitocannabinoides (fCBs).....	5
2.1.3. Aceite de cannabis de amplio espectro rico en CBD (CBD/AE). ....	6
2.2. Endocannabinoidoma (eCBoma). ....	9
2.4. Enfermedad inflamatoria intestinal (EII). ....	9
2.4.1. LPS en inflamación intestinal.....	11
2.5. PEPT1.....	12
2.5.1. PEPT1 en inflamación intestinal.....	15
2.6. eCBoma y fCBs en intestino. ....	16
3. JUSTIFICACIÓN. ....	19
4. HIPÓTESIS. ....	20
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	21
5.1. Objetivo general. ....	21
5.2. Objetivos particulares. ....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	22
6.1. Lugar de estudio. ....	22
6.2. Aceite de cannabis de amplio espectro rico en Cannabidiol (CBD/AE)...	22
6.3. Animales de experimentación.....	23
6.4. Diseño experimental. ....	23
6.5. Inducción del modelo de inflamación por LPS.....	24
6.6. Tratamientos. ....	24
6.7. Tranquilización y sacrificio. ....	24
6.8. Toma de muestras. ....	25
6.9. Análisis histológico. ....	25
6.10. Análisis semicuantitativo. ....	26

6.11. Inmunohistoquímica .....	27
6.12. Cuantificación de la Densidad Integrada.....	27
6.13. Extracción de ARN total.....	28
6.14. Síntesis de ADN complementario.....	28
6.15. Diseño de oligonucleótidos.....	28
6.16. Análisis de datos. ....	30
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
7.1. Modelo de inflamación.....	31
<u>7.1.1. Análisis histológico. ....</u>	<u>31</u>
<u>7.1.2. Análisis semicuantitativo de inflamación en intestino delgado.....</u>	<u>41</u>
<u>7.1.3. Análisis semicuantitativo de intestino grueso. ....</u>	<u>42</u>
<u>7.1.4. Expresión de citocinas y receptores TLR.....</u>	<u>43</u>
7.2. Expresión de PEPT1 y PPAR $\alpha$ en intestino.....	49
<u>7.2.1. PEPT1.....</u>	<u>49</u>
<u>7.2.2. PPAR<math>\alpha</math> .....</u>	<u>57</u>
<u>7.2.3. Comparación de expresión de ARNm PEPT1 y ARNm PPAR<math>\alpha</math>. .....</u>	<u>65</u>
<b>8. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>66</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>77</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>78</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>89</b>
12.1. Técnica histológica: procesamiento de muestras.....	89
12.2. Tinción de Hematoxilina & Eosina.....	90
<u>12.2.1. Reactivos utilizados en la tinción H&amp;E. ....</u>	<u>91</u>
12.3. Tinción de Ácido Peryódico de Schiff.....	93
<u>12.3.1. Reactivos utilizados en la tinción de PAS.....</u>	<u>94</u>
12.4. Análisis de fitocannabinoides contenidos en el extracto CBD/AE. ....	95



## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1: Componentes químicos identificados en <i>Cannabis sativa</i> .	4
Tabla 2: Clases químicas de fitocannabinoides.	5
Tabla 3: Fitocannabinoides contenidos en el CBD/AE.	22
Tabla 4: Distribución de grupos experimentales.	23
Tabla 5: Oligonucleótidos diseñados.	29
Tabla 6: Análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos en intestino delgado de ratones BALB/c.	41
Tabla 7: Análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos en intestino grueso de ratones BALB/c.	42
Tabla 8: Procedimiento de deshidratación.	89
Tabla 9: Desparafinación e Hidratación	89
Tabla 10: Pasos para la tinción de H&E.	90
Tabla 11: Reactivos para la preparación de Hematoxilina de Gill.	91
Tabla 12: Preparación de solución de stock de Eosina.	91
Tabla 13: Preparación de la tinción de Eosina.	91
Tabla 14: Preparación de la solución de alcohol-ácido.	92
Tabla 15: Preparación de la solución de agua amoniacal.	92
Tabla 16: Pasos para la tinción de PAS.	93
Tabla 17: Preparación de la solución acuosa de ácido periódico al 0.5%.	94
Tabla 18: Preparación de la solución enjuagadora sulfurosa.	94
Tabla 19: Preparación de la solución de metabisulfito de sodio.	94
Tabla 20: Preparación de la solución de ácido clorhídrico al 1N.	94

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Mecanismos potenciales de las interacciones PPAR-fitocannabinoides (pCBs).	14
Figura 2: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino delgado de ratones BALB/c, empleando tinción H&E.	33
Figura 3 Efecto de los diferentes tratamientos en intestino delgado de ratones BALB/c como modelo de inflamación, empleando tinción H&E.	34
Figura 4: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino grueso de ratones BALB/c, empleando tinción H&E.	35
Figura 5: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino grueso de ratones BALB/c como modelo de inflamación, empleando tinción H&E.	36
Figura 6: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino delgado de ratones BALB/c, empleando histoquímica de PAS.	37
Figura 7: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino delgado de ratones BALB/c como modelo de inflamación, empleando histoquímica de PAS.	38
Figura 8: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino grueso de ratones BALB/c, empleando histoquímica de PAS.	39
Figura 9: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino grueso de ratones BALB/c como modelo de inflamación, empleando histoquímica de PAS.	40
Figura 10: Efecto del CBD/AE en la expresión de citocinas proinflamatorias y receptores TLR2 y TLR4 en intestino delgado de ratones BALB/c ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).	44
Figura 11. Efecto del CBD/AE en la expresión de citocinas antiinflamatorias en intestino delgado ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).	45
Figura 12: Efecto del CBD/AE en la expresión de citocinas proinflamatorias en intestino grueso ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).	47
Figura 13: Efecto del CBD/AE en la expresión de citocinas antiinflamatorias en intestino grueso ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).	48
Figura 14: Inmunomarcaje anti-PEPT1 en intestino delgado de ratones BALB/c, mediante inmunohistoquímica.	50
Figura 15: Inmunomarcaje anti-PEPT1 en intestino delgado de ratones BALB/c como modelo de inflamación, mediante inmunohistoquímica.	51
Figura 16: Inmunomarcaje anti-PEPT1 en intestino grueso de ratones BALB/c, mediante inmunohistoquímica.	52

Figura 17: Inmunomarcaje anti-PEPT1 en intestino grueso de ratones BALB/c como modelo de inflamación, mediante inmunohistoquímica.	53
Figura 18: Expresión de ARNm y proteína PEPT1 en intestino delgado de ratones BALB/c.	54
Figura 19: Expresión de ARNm y proteína PEPT1 en intestino grueso de ratones BALB/c.	55
Figura 20: Expresión de ARNm y proteína PEPT1 en intestino de ratones BALB/c.	56
Figura 21: Inmunomarcaje anti-PPAR $\alpha$ en intestino delgado de ratones BALB/c, mediante inmunohistoquímica.	58
Figura 22: Inmunomarcaje anti-PPAR $\alpha$ en intestino delgado de ratones BALB/c como modelo de inflamación, mediante inmunohistoquímica.	59
Figura 23: Inmunomarcaje anti-PPAR $\alpha$ en intestino grueso de ratones BALB/c, mediante inmunohistoquímica.	60
Figura 24: Inmunomarcaje anti-PPAR $\alpha$ en intestino grueso de ratones BALB/c como modelo de inflamación, mediante inmunohistoquímica.	61
Figura 25: Expresión de ARNm y proteína PPAR $\alpha$ en intestino delgado de ratones BALB/c.	62
Figura 26: Expresión de ARNm y proteína PPAR $\alpha$ en intestino grueso de ratones BALB/c.	63
Figura 27: Expresión de ARNm y proteína PPAR $\alpha$ en intestino de ratones BALB/c.	64
Figura 28: Expresión de ARNm de PEPT1 y PPAR $\alpha$ en intestino de ratones BALB/c.	65
Figura 29: Análisis de expresión de las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$ en intestino delgado de los grupos tratados con LPS: LPS y LPS-CBD/AE.	72
Figura 30: Análisis de expresión de las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$ en intestino delgado de los grupos tratados con LPS: LPS y LPS-CBD/AE.	75

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Agua inyectable
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AU	Aceite de uva
CBD	Cannabidiol
CBD/AE	Aceite de cannabis de amplio espectro rico en CBD
CBG	Cannabigerol
CBSH	Comité de Bioseguridad e Higiene
CB <sub>x</sub>	Receptores Cannabinoides
CIBAEI	Comité Interno de Bienestar Animal en la Enseñanza e Investigación
eCBoma	Endocannabinoidoma
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
fCBs	Fitocannabinoides
H&E	Hematoxilina y Eosina
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolisacárido
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
PEPT1	Transportador de oligopéptidos 1
PPAR	Receptor activado por proliferador del peroxisoma
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativo
SEC	Sistema endocannabinoide
<i>SLC15A1</i>	<i>Solute Carrier 15 A 1</i>
ST	Sin tratamiento
THC	Tetrahidrocannabinol
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>

TRL2

*Toll-like receptor 2*

## RESUMEN

La planta de cannabis (*Cannabis sativa* L.) es capaz de modular numerosos procesos fisiológicos y patológicos en animales a través de sus interacciones con la Endocannabinoidoma (eCBoma). Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) se ven afectadas por las actividades de la eCBoma y aún hay numerosos mecanismos desconocidos bajo los cuales ocurre esto. PEPT1, un co-transportador de péptidos en intestino, también se ha visto asociado a las EII, con reportes contradictorios sobre su papel en estas enfermedades. La expresión intestinal de PEPT1 se ha asociado a la actividad transcripcional de PPAR $\alpha$ , un factor de transcripción que puede ser activado por ligandos cannabinoides y cuyo papel en intestino está relacionado a la modulación de los procesos inflamatorios. El presente estudio, tuvo como objetivo el análisis de expresión de PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino delgado y grueso de ratones BALB/c sanos y como modelo de inflamación intestinal inducido por LPS, bajo el estímulo de un aceite de cannabis de amplio espectro rico en cannabidiol (CBD/AE). Los ratones fueron tratados durante 5 días con LPS de *Salmonella typhimurium* por vía intraperitoneal y posteriormente fueron tratados durante 2 días con CBD/AE (vehículo o agua inyectable) a dosis de 100 mg/kg. Los individuos sanos se trataron con el mismo aceite (vehículo o agua inyectable) durante dos días a la misma dosis. Finalmente, los animales fueron eutanasiados, y se obtuvieron muestras de intestino delgado e intestino grueso para histopatología, inmunohistoquímica indirecta y análisis de expresión de citocinas, de PEPT1 y PPAR $\alpha$ . Se observó la expresión de PEPT1 en colon sano, se observó que la administración de CBD/AE produce un aumento a nivel de ARNm de PEPT1 en intestino delgado sano. El LPS produce aumentos en la expresión de ambas proteínas y el CBD/AE disminuye la expresión intestinal de PEPT1. Ambas proteínas se encuentran en células presentes en la lámina propia intestinal y se vieron asociadas a los cambios en el infiltrado celular en esta región. Estos resultados muestran que el CBD/AE podría disminuir el proceso inflamatorio inducido por LPS en intestino a través de la modulación de estas dos proteínas a nivel de células de la lámina propia.

## ABSTRACT

The cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) is capable of modulating numerous physiological and pathological processes in animals through its interactions with the Endocannabinoidome (eCBome). Inflammable Bowel Diseases (IBDs) are affected by the eCBome activities and there's still numerous unknown mechanisms by which this occurs. PEPT1, an intestinal peptide co-transporter, has been associated to IBD, with contradictory reports about its role in these diseases. The intestinal expression of PEPT1 has been associated with the transcriptional activity of PPAR $\alpha$ , a transcription factor that can be activated by cannabinoid ligands and its role in the intestine is related to the modulation of the inflammatory processes. The present study had as objective the expression analysis of PEPT1 and PPAR $\alpha$  in small and large intestine of healthy BALB/c mice and as a model in intestinal inflammation induced by LPS under the stimuli of a cannabidiol enriched broad spectrum cannabis oil (CBD/BS). Mice were treated for 5 days with intraperitoneal *Salmonella typhimurium* LPS and then were treated for 2 days with CBD/BS (vehicle or injectable water) at a dose of 100 mg/kg. Healthy individuals were treated with the same oil (vehicle or injectable water) for 2 days at the same dose. Finally, animals were euthanized, and samples of small and large intestine were obtained for histopathology, indirect immunohistochemistry and expression analysis of cytokines, PEPT1 and PPAR $\alpha$ . We observed the expression of PEPT1 in healthy colon, we observed that the administration on CBD/BS produces an increment of mRNA PEPT1 in healthy small intestine. LPS produces increments in the expression of both proteins and CBD/BS decreases the intestinal expression of PEPT1. Both proteins can be found in intestinal lamina propria associated cells and were associated to the changes in the cell infiltrate in this region. These results show that CBD/BS could diminish the intestinal inflammatory process induced by LPS through modulation of these two proteins at a lamina propria level.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La planta de cannabis (*Cannabis sativa* L.) ha sido ancestralmente cultivada por el ser humano para numerosos usos (Żuk-Gołaszewska et al., 2018) entre los que destacan sus usos medicinales. Esta planta es productora de numerosos compuestos medicinalmente importantes entre los que podemos destacar a los fitocannabinoides, tales como el tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD); entre otros tantos (ElSohly et al., 2017). La planta de cannabis ha sido utilizada para el tratamiento de numerosas enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas, entre otras (Toczek & Malinowska, 2018). Algunos fitocannabinoides muy bien estudiados, como el THC, son abundantes en la planta de cannabis (Ladha et al., 2020). No obstante, debido a que es el principal responsable de los efectos “psicoactivos” y efectos secundarios de la planta de cannabis, su uso terapéutico se ve limitado (Bitencourt & Takahashi, 2018). Otros fitocannabinoides clasificados como “no psicotrópicos”, tales como el CBD y el CBG han mostrado potencial terapéutico en una amplia gama de enfermedades con rangos de seguridad muy amplios (Brierley et al., 2016; Iffland & Grotenhermen, 2017). Los fitocannabinoides, y otros compuestos de la planta de cannabis, pueden interactuar con un complejo sistema de señalización celular denominado “Sistema Endocannabinoide Agrandado” o “Endocannabinoide”. Este sistema abarca tanto al conocido “Sistema Endocannabinoide (SEC)” como a numerosos receptores, ligandos endógenos (cannabinoides endógenos, principalmente) y proteínas enzimáticas y de transporte (Di Marzo & Piscitelli, 2015). Componentes de la eCBoma han sido encontrados casi todos los animales vertebrados y en algunos invertebrados (Hartsel et al., 2019) y se ha visto involucrado en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos tales como el desarrollo embrionario, plasticidad neuronal, dolor, inflamación, regulación metabólica, crecimiento, entre muchos otros (Bukiya, 2019; Silver, 2019). Numerosos componentes de la eCBoma se han visto involucrados en la homeostasis intestinal, así como en cuadros fisiopatológicos (Pesce et al., 2017), esto lo convierte en un blanco terapéutico para el uso de cannabinoides de la planta para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (EII) (Carvalho et al., 2020). Este sistema puede ser modulado con fines terapéuticos de diversas formas tales como la administración de cannabinoides exógenos, como los fitocannabinoides; y la



inhibición de la degradación enzimática de los cannabinoides endógenos (Toczek & Malinowska, 2018).

Las EII son parte de las enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal y comprenden un grupo de enteropatías que comparten características en común, y afectan tanto a humanos como otros animales (Jergens & Simpson, 2012). No se conoce del todo la etiología de las EII pero se sabe que comprometen la absorción nutricional (Stephens & von der Weid, 2020), así como la respuesta inmune normal a la microbiota normal del TGI (Ingersoll et al., 2012). Durante las EII, ocurre una translocación de bacterias y/o sus productos como el lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular bacteriana que contribuye a la patogénesis de las EII (Schoultz & Keita, 2020).

Otro componente de importancia en las EII es PEPT1. PEPT1 es un co-transportador intestinal de péptidos capaz de transportar numerosos péptidos de la dieta, péptidos bacterianos (Spanier & Rohm, 2018), fármacos peptidomiméticos (Wang et al., 2017), entre otras funciones; cuyo papel en el desarrollo de las EII aún es controversial. Datos contrastantes han surgido entorno a su localización, expresión y función durante la fisiología normal intestinal y durante cuadros inflamatorios intestinales (Wuensch et al., 2014; Viennois et al., 2016; Zhang et al., 2016). La expresión de PEPT1 puede ser estimulada por diversos factores, entre los que se encuentra la actividad transcripcional de un factor nuclear activado por ligando conocido como PPAR $\alpha$  (Receptor Activado por Proliferador de Peroxisoma), un miembro de la superfamilia de receptores nucleares (NR) (Okamura et al., 2014). Este receptor nuclear tiene afinidad a ligandos lipídicos tales como cannabinoides endógenos, sintéticos y fitogénicos (Iannotti & Vitale, 2021), además de que se ha asociado su presencia en intestino con el control de la respuesta inflamatoria (Azuma et al., 2010).

En el presente trabajo se evaluaron los cambios en la expresión de las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino delgado y grueso de un modelo murino de inflamación inducido por LPS, así como su comportamiento a nivel de expresión al administrarse un aceite de cannabis de amplio espectro rico en cannabidiol (CBD/AE), y su posible asociación entre sí y con respecto al proceso inflamatorio.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Cannabis sativa* L.

La planta de cannabis (*Cannabis sativa* L.) ha sido cultivada por el humano desde hace miles de años por sus numerosas propiedades, siendo posiblemente una de las plantas más antiguas que éste ha cultivado (Żuk-Gołaszewska et al., 2018). Según la literatura, los orígenes evolutivos del género de la planta apuntan a las laderas de los Himalayas (Clarke & Watson, 2007; Russo, 2007; ElSohly et al., 2017; Farag & Kayser, 2017). Actualmente es una planta de distribución cosmopolita y que posee una enorme diversidad genética (Hillig, 2005). El cannabis (también denominado cáñamo o mariguana) se ha cultivado por sus propiedades medicinales, para la obtención de fibra, aceites (Farag & Kayser, 2017) propiedades nutricionales (semilla) (Leizer et al., 2015), entre otros; y se ha estudiado su potencial terapéutico por ser productora de numerosos compuestos medicinalmente importantes entre los que destacan los fitocannabinoides, como en THC (Tetrahidrocannabinol) y el CBD (Cannabidiol) los terpenos y los flavonoides (ElSohly et al., 2017).

#### 2.1.1. Taxonomía y botánica.

El género *Cannabis*, pertenece a la familia *Cannabaceae*, al igual que el género *Humulus* (lúpulo). Actualmente, esta familia abarca también a 8 miembros formalmente encontrados en la familia *Celtidaceae* (McPartland, 2018). *Cannabis sativa* L. es una planta de floración anual y generalmente dioica (plantas hembra y plantas macho), aunque el hermafroditismo es posible en algunos cultivares. Es una planta de crecimiento rápido (hasta 10 cm al día) que puede alcanzar alturas de hasta 6 m. Las plantas de cannabis se encuentran recubiertas de tricomas, clasificados en dos tipos: glandulares y no glandulares. Únicamente los tricomas glandulares producen cannabinoides en cantidades considerables y éstos se encuentran principalmente en las brácteas y hojas florales de las plantas hembra. Debido a esta distribución de tricomas, las plantas hembra son las que se utilizan para fines medicinales o recreativos. La taxonomía de las especies y subespecies dentro del género *Cannabis* ha sido tema de debate histórico. La facilidad de hibridación de las especies dio como resultado un extensivo, y muchas veces clandestino, entrecruzamiento, lo que dificulta aún más la

distinción entre variedades. Actualmente existe una amplia diversidad de caracteres químicos y morfológicos que dificulta su clasificación formal por lo que se han establecido diversos sistemas de identificación. Algunos de estos sistemas incluyen la diferenciación entre las variedades de fibra (cáñamo industrial) y de droga (medicinal o recreacional) según su contenido de THC o relación THC/CBD. Existen otros tipos de clasificaciones pero es un tema que aún se encuentra en debate (Monthony et al., 2021).

La planta de cannabis es productora de numerosos compuestos orgánicos y se han aislado e identificado más de 500 (Tabla 1) (ElSohly et al., 2017).

Tabla 1: Componentes químicos identificados en *Cannabis sativa*.

Clase química	Compuestos identificados
Terpenos	140
Cannabinoides	113
Hidrocarburos	50
Azúcares y compuestos relacionados	34
Compuestos nitrogenados	27
Fenoles no cannabinoides	25
Ácidos grasos	23
Flavonoides	23
Ácidos simples	20
Cetonas simples	13
Lactonas y ésteres simples	13
Aldehídos simples	12
Proteínas, enzimas y glucoproteínas	11
Esteroides	11
Elementos	9
Alcoholes simples	7
Vitaminas	3
Pigmentos	2

Obtenido de (Hartsel et al., 2019).

### 2.1.2. Fitocannabinoides (fCBs).

De los compuestos producidos por la planta, los más estudiados por su potencial terapéutico son los fitocannabinoides, seguido de los terpenos y los flavonoides. Químicamente los fitocannabinoides se definen como: “meroterpenoides con un núcleo de resorcinol típicamente decorado con una cadena lateral de isoprenol, alquilo o aralquilo *para*-posicionada” (Gülck & Møller, 2020). El término también se refiere a cualquier compuesto natural derivado de la planta que actúa como ligando de los receptores cannabinoides humanos CB1 y CB2, o comparte similitudes químicas con cannabinoides (Degenhardt et al., 2017). Se han identificado más de 100 fitocannabinoides (Citti et al., 2019) y se han categorizado en 11 clases químicas diferentes (Tabla 2) cuya proporción en la planta está sujeta a variaciones dependientes de factores como condiciones de crecimiento, localización geográfica, métodos de procesado de la planta y la variedad o quimiotipo (Turner et al., 2017).

Tabla 2: Clases químicas de fitocannabinoides.

Clase química
Tipo $\Delta^9$ - <i>trans</i> -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC)
Tipo $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC)
Tipo Cannabinol (CBN)
Tipo Cannabidiol (CBD)
Tipo Cannabicromeno (CBC)
Tipo Cannabigerol (CBG)
Tipo Cannabinodiol (CBND)
Tipo Cannabielsoino (CBE)
Tipo Cannabiciclol (CBL)
Tipo Cannabacitrán (CBT)
Tipo misceláneo

Obtenido de (Turner et al., 2017).

De éstos, los más abundantes y mejor estudiados son el THC y el CBD (Ladha et al., 2020). El THC se ha definido como el principal responsable de los efectos psicoactivos del cannabis y es responsable de ciertos efectos secundarios no deseados característicos (Bitencourt & Takahashi, 2018). Por su parte, el CBD no presenta estos

efectos y se ha demostrado que es capaz de interactuar con una amplia gama de receptores endógenos (Turner et al., 2017).

### **2.1.3. Aceite de cannabis de amplio espectro rico en CBD (CBD/AE).**

Los extractos de cannabis ricos en CBD se han categorizado en tres tipos: espectro completo, si contiene otros cannabinoides (incluyendo THC), terpenos y flavonoides; amplio espectro, similar al amplio espectro con la excepción que es libre de THC; y CBD aislado, que contiene CBD puro. Algunos de los beneficios clínicos se han observado con el uso de productos de espectro completo y de amplio espectro, asociado a la posible acción sinérgica, denominada efecto séquito, que ocurre entre varios fitocannabinoides, así como otros constituyentes de la planta (Cather & Cather, 2020).

El cannabidiol es un fitocannabinoide no intoxicante. Generalmente se le refiere como “no psicoactivo”, sin embargo, podría modular síntomas en ciertos desórdenes neurológicos, por lo que es más apropiado denominarlo como no intoxicante. El CBD no causa adicción y tampoco induce efectos secundarios serios (Kicman & Toczek, 2020). Éste representa la tercera clase química más abundante y ha sido sujeto de extensivo estudio por su capacidad de interactuar con numerosos receptores en animales. Los efectos fisiológicos del CBD están mediados por múltiples mecanismos diana entre los que se encuentran receptores cannabinoides (CB<sub>x</sub>), otros receptores acoplados a proteína G, receptores de glicina, 5-HT, PPARs, TRPs, entre otros (Turner et al., 2017). Además de interactuar directamente con receptores, al ser degradado por la enzima FAAH (*fatty acid amide hydrolase*; ácido graso amida hidrolasa), principal enzima que degrada cannabinoides endógenos como la anandamida, puede inhibir su actividad sobre ésta, estimulando el tono de cannabinoides endógenos (Toczek & Malinowska, 2018) y su señalización (Fernández-Ruiz et al., 2015).

A este fitocannabinoide se le han asociado numerosos efectos farmacológicos benéficos como antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, antiartrítico, anticonvulsivo, neuroprotector, procognitivo, ansiolítico, antipsicótico y antiproliferativo, entre otros. Muchos de sus beneficios terapéuticos se han reportado

en modelos experimentales. Por ejemplo, de enfermedades cardíacas, infarto, accidente cerebrovascular, encefalopatía isquémica hipóxica neonatal, encefalitis asociada a sepsis, complicaciones cardiovasculares por diabetes, lesiones isquémicas o por reperfusión hepática y renal. Su potencial terapéutico es muy amplio pudiendo abarcar trastornos como: epilepsia, enfermedades neurodegenerativas, desórdenes gastrointestinales como las enfermedades inflamatorias intestinales, reumáticas, de injerto contra huésped y cáncer. No obstante, aún se requieren más investigaciones clínicas para demostrar su efectividad (Kicman & Toczek, 2020).

Numerosos estudios han descrito el perfil de seguridad del CBD, inclusive administrado a dosis altas. Principalmente se ha visto que su administración no afecta adversamente funciones psicológicas o psicomotoras, además de no alterar parámetros fisiológicos como ritmo cardíaco, presión sanguínea y temperatura corporal. En humanos se ha reportado que el uso crónico y a dosis altas de hasta 1500 mg por día han sido muy bien toleradas (Iffland & Grotenhermen, 2017). En ratones, se ha reportado que dosis de hasta 120 mg/kg por vía oral o intraperitoneal no produjeron efectos comportamentales negativos (Deiana et al., 2012). Estudios recientes en ratones B6C3F<sub>1</sub>, utilizaron dosis crecientes de un extracto de cannabis rico en CBD para inducir toxicidad aguda (0, 246, 738 o 2460 mg/kg de CBD) y toxicidad sub-aguda (0, 61.5, 184.5 o 615 mg/kg por 10 días) por vía oral. Los ratones administrados con dosis de 738 y 2460 mg/kg mostraron disminución del apetito y desarrollaron una condición sub-letárgica, además de alteraciones en proteínas ALT y AST y alteraciones en la relación de peso hígado-peso corporal sin diferencias histomorfológicas apreciables. Los ratones administrados por vía oral con 615 mg/kg de CBD mostraron letargia profunda, pérdida de apetito y pérdida de peso. A nivel histopatológico se observó un aumento del volumen citoplasmático pan-hepático y focos de hinchazón citoplasmática con la dosis de 184.5 mg/kg de CBD.

Finalmente, los autores mencionan que dosis tan altas como 2460 mg/kg de CBD no es aplicable a la mayoría de los escenarios en la vida real pero proveen información sobre las consecuencias potenciales por sobredosis de CBD y destacan la necesidad de más estudios crónicos y sub-crónicos (Ewing et al., 2019). Estudios en modelos animales indican que a dosis terapéuticas agudas o crónicas de CBD hay una buena tolerancia y falta de efectos secundarios observables o relevantes (Iffland & Grotenhermen, 2017). Finalmente, un aspecto que ha causado controversia sobre el

uso de cannabidiol es su posible conversión a THC dentro del organismo, causando “psicoactividad” (Merrick et al., 2016). No obstante, esto fue refutado por Franjo Grotenhermen, Ethan Russo y Antonio Waldo en 2017, aseverando que numerosos estudios clínicos con dosis altas de CBD oral no mostraron efectos similares al THC o al cannabis, y tampoco se han detectado niveles del metabolito del THC (11-OH-THC) en sangre cuando éste se administra por tiempos prolongados. Los autores concluyen que en condiciones normales el CBD no se degrada en cannabinoides psicoactivos como lo hizo en las condiciones experimentales de Merrick et al. (2016), cuyo modelo de estudio fue un ambiente *in vitro* ácido similar al estómago; y que disolver el CBD en metanol es inapropiado para experimentos en humanos y que su uso podría incurrir en el error al momento de extrapolar el estudio *in vitro* de Merrick et al. en una situación *in vivo* (Grotenhermen et al., 2017).

Además de CBD, el CBG es otro fitocannabinoide contenido en algunos extractos de amplio espectro. El CBG pertenece a los fitocannabinoides no psicotrópicos y su forma carboxílica ácida (ácido cannabigerólico o CBGA) es precursor de las formas ácidas del  $\Delta^9$ -THC (ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico  $\Delta^9$ -THCA), el CBD (ácido cannabidiólico CBDA) y el CBC (ácido cannabicroménico CBCA). Este fitocannabinoide también puede afectar el tono de cannabinoides endógenos indirectamente, inhibiendo la recaptación de anandamida y por ende, aumentando sus niveles (Turner et al., 2017). El cannabigerol actualmente está siendo estudiado por su potencial terapéutico y se ha usado en ratas pre-saciadas como un estimulante del apetito que no mostró efectos similares al THC o alteraciones comportamentales o efectos perjudiciales en el balance, control motor o fuerza muscular incluso a dosis de 240 mg/kg (Brierley et al., 2016).

Se ha propuesto que el CBG actúa a través de múltiples receptores diana como PPARs, TRPs, canales iónicos de calcio tipo L y sodio; así como la inhibición de enzimas degradadoras de cannabinoides endógenos como MAGL (*monoacylglycerol lipase*; monoacil glicerol lipasa), inhibición de la recaptación de dopamina, 5-HT, norepinefrina y de ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA); entre otros. Sus efectos antiinflamatorios y analgésicos podrían involucrar diferentes niveles en las vías de la síntesis de prostaglandinas o inhibición de MAGL, y el agonismo o bloqueo de múltiples receptores (Deiana, 2017). El cannabigerol ha mostrado efectos antiproliferativos, antibacterianos y anti-glaucoma. En un modelo de inflamación

intestinal inducido por DNBS (ácido dinitrobenzenosulfónico) en ratones, el CBG demostró reducir la severidad y extensión de la respuesta inflamatoria al ser administrado antes y después de la inducción de inflamación a dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente (Borrelli et al., 2013).

## **2.2. Endocannabinoidoma (eCBoma).**

El sistema endocannabinoide (SEC) se ha visto involucrado en numerosos procesos biológicos como en el desarrollo temprano desde la implantación embrionaria hasta el desarrollo postnatal (Bukiya, 2019), plasticidad neuronal, dolor, ansiedad, inflamación, neuroinflamación, función inmune, regulación metabólica, crecimiento óseo entre otros (Silver, 2019). Su modulación por cannabinoides se ha utilizado limitadamente para aliviar dolor, espasticidad en esclerosis múltiple, náuseas y vómito inducidos por quimioterapia, estimulación del apetito en el síndrome de emaciación (Toczek & Malinowska, 2018).

Conforme surgieron descubrimientos sobre componentes del SEC y otros mediadores diana de los cannabinoides, surgió la necesidad de expandir el concepto del SEC para intentar comprender a la inmensa cantidad de mediadores lipídicos, receptores, enzimas y transportadores que se ha visto interactúan directa o indirectamente con cannabinoides fitogénicos o sintéticos (SCBs). Los mediadores de los efectos de los fitocannabinoides, y otros compuestos de la planta de cannabis, no se limitan al SEC. Debido al gran número de estos mediadores fisiológicos, recientemente se ha propuesto el término de ‘‘Endocannabinoidoma (eCBoma)’’ para intentar englobarlos (Di Marzo & Wang, 2015; Arturo & Fabiana, 2018). Entre estos podemos encontrar a los receptores activados por proliferador de peroxisoma (PPARs) (D’Aniello et al., 2019).

## **2.4. Enfermedad inflamatoria intestinal (EII).**

Las enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal incluyen la enfermedad celiaca y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) o ‘‘*Inflammatory Bowel Disease*’’, principalmente. EII es un término aplicado a un grupo de enteropatías crónicas que comparten ciertas características en común y se han descrito en animales



y humanos (Jergens & Simpson, 2012), donde se incluyen principalmente a la enfermedad de Crohn, que involucra inflamación en cualquier sitio a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI); y la colitis ulcerativa, que implica inflamación de larga duración en algunos sitios del TGI, principalmente en colon. La etiología exacta de la EII no está del todo clara pero se asocia a diversos factores como contaminación bacteriana, cambios en el sistema inmune y variaciones genéticas (Fakhoury et al., 2014). Tanto la colitis ulcerativa como la enfermedad de Crohn resultan en una absorción nutricional deteriorada, aumento del reclutamiento celular e inflamación crónica, que puede traer complicaciones sistémicas como fiebre, pérdida de peso, retraso del crecimiento, entre otros (Stephens & von der Weid, 2020). Durante la patogénesis de EII, la microbiota intestinal se ve sustancialmente alterada (Stephens & von der Weid, 2020) y ocurren alteraciones en la respuesta inmune a la microbiota del TGI en individuos genéticamente predispuestos a EII, caracterizado por una alteración en la barra intestinal epitelial y el influjo de células inmunes. Estos eventos aumentan el alcance de la inflamación y regulan la producción de citocinas proinflamatorias (Ingersoll et al., 2012). En las EIIs se ha reportado una disminución funcional de la barrera intestinal, lo que permite la translocación de bacterias y productos bacterianos del lumen intestinal, a través de la capa de células epiteliales, hacia la mucosa adyacente (Schoultz & Keita, 2020).

Una de las actividades importantes del epitelio intestinal es la modulación del sistema inmune innato y adaptativo (Ingersoll et al., 2012). La barrera intestinal es un sistema complejo que representa una pared física y funcional compuesta de 4 elementos principales: 1, la fosfatasa alcalina intestinal (IAP), que se encarga de desfosforilar el lipopolisacárido (LPS) bacteriano del lumen para su detoxificación; 2, la capa mucosa que sirve como barrera física previniendo interacciones entre las bacterias lumbales y las células epiteliales del intestino; 3, las uniones herméticas entre las células epiteliales, que limitan el transporte paracelular de bacterias y sus productos a circulación sistémica; y 4, las proteínas antibacterianas secretadas por las células de Paneth e IgA por células inmunes en lámina propia (Ghosh et al., 2020). Cuando el balance entre las bacterias comensales y patógenas se interrumpe y ocurren alteraciones en la barrera intestinal, productos bacterianos como el LPS pueden interactuar directamente con la membrana basal de los enterocitos y tejido adyacente. Generalmente el sistema inmune se encarga del proceso inflamatorio pero en algunos

casos las bacterias logran entrar a circulación y altas concentraciones de LPS pueden ocasionar shock séptico (Schoultz & Keita, 2020). La deficiencia en las uniones herméticas de la barrera intestinal es un factor de importancia en la patología de las EIIs, que se caracterizan por un aumento de la permeabilidad intestinal y del pasaje de antígenos lumenales, lo que promueve la respuesta inflamatoria (Guo et al., 2015).

#### **2.4.1. LPS en inflamación intestinal.**

El lipopolisacárido (LPS) es un componente principal de la pared celular en bacterias Gram negativas y cumple roles importantes en la integridad celular bacteriana, viabilidad y defensa contra estrés medioambiental. Es una molécula anfifílica termoestable que se compone de 3 regiones: lípido A, un núcleo de polisacáridos u oligosacáridos y antígeno O. El LPS se encuentra altamente conservado entre casi todas las bacterias Gram negativas y es un potente inductor de respuestas inflamatorias (Mazgaeen & Gurung, 2020). Contrario al concepto que comúnmente se tiene del LPS, éste no es igual entre especies bacterianas y se ha reportado que algunos de sus efectos dependen de la especie o serotipo bacteriano debido a diferencias estructurales. Finalmente, el LPS se utiliza ampliamente en estudios *in vitro* e *in vivo* como estimulante o co-estimulante (Stephens & von der Weid, 2020).

El LPS en el organismo es reconocido como un potente PAMP (patrón molecular asociado a patógenos), a través de interacciones con receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como el TLR4 (toll-like receptor 4) y otras proteínas como la proteína de unión a LPS (LPB), CD14 y MD2 (Ain et al., 2020). También se han propuesto que algunos receptores de potencial transitorio (TRPs) podrían estar involucrados en la detección del LPS (Mazgaeen & Gurung, 2020), así como posiblemente el receptor TLR2 (Yang et al., 1999; Splichal et al., 2020).

El receptor TLR4 se encuentra expresado en niveles basales en intestino, pero en EII se encuentra altamente expresado. Su activación estimula la liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas. La falta de señalización por TLR4 durante lesiones en la mucosa resulta en fallas en la proliferación epitelial, respuesta inflamatoria debilitada y un aumento en la traslocación bacteriana, lo que resulta en

un daño más severo a la mucosa (Bein et al., 2017). A pesar de los efectos positivos del receptor TLR4 en infecciones bacterianas, estudios han relacionado el aumento de la permeabilidad de las uniones herméticas en intestino con las cascadas de señalización mediadas por la unión de LPS-TLR4 ( Guo et al., 2015; Bein et al., 2017; Stephens & von der Weid, 2020). Por otra parte, se ha reportado que, en colon humano saludable, las células epiteliales intestinales secretan bajos niveles de receptores TLR2 y TLR4. Otras poblaciones celulares intestinales como células de Paneth, células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas (CDs) también expresan TLR2 y TLR4 en niveles bajos. Este patrón de expresión de TLRs varía en condiciones patológicas. En pacientes con EII se han reportado diferencias en los patrones de expresión de TLR2 y TLR4, por ejemplo las células epiteliales intestinales de pacientes con EII han mostrado mayores niveles de TLR4, principalmente, y niveles inferiores de TLR2; sin embargo en células inflamatorias de la lámina propia se ha visto niveles de expresión de ambos TLRs incrementados durante cuadros inflamatorios de EII (Hug et al., 2018).

## **2.5. PEPT1**

Una de las funciones más remarcables del intestino delgado es la absorción de nutrientes de la dieta, incluyendo péptidos producto de la degradación de proteínas (Zhang et al., 2016), además de su función como barrera capaz de proteger e interactuar con antígenos y bacterias del lumen (Schoultz & Keita, 2020). En este tejido, PEPT1 es el principal co-transportador mediante el cual se da la absorción de di- y tripéptidos (Spanier & Rohm, 2018) entre otras funciones importantes. El transportador de péptidos 1 o PEPT1 (SLC15A1) es un miembro de la superfamilia de transportadores de solutos encontrado en la membrana apical en enterocitos (Mooij et al., 2016). A través de diversos ensayos se ha estimado que PEPT1 posee gran cantidad de sustratos para transporte en donde se incluyen alrededor de 400 dipéptidos diferentes y 8,000 tripéptidos producto de la digestión dietaria de proteínas y compuestos similares (Wang et al., 2017). PEPT1 se ha convertido en un blanco importante de terapia por su papel en la biodisponibilidad de múltiples fármacos peptidomiméticos como agentes anticancerígenos, bestatina, antibióticos  $\beta$ -lactámicos, enzima convertidora de angiotensina (ACE), inhibidores de hipertensión y fármacos antivirales (Wang et al.,

2017), entre otros. También se ha estudiado el papel de PEPT1 en la absorción de péptidos bacterianos y el subsecuente estímulo de la respuesta inmune inflamatoria (Ingersoll et al., 2012; Wuensch et al., 2014; Spanier & Rohm, 2018). Por último, se menciona que PEPT1 juega un rol importante en múltiples funciones biológicas en el intestino delgado como regulador de la expresión y secreción de microARNs específicos, que regulan los niveles de expresión de múltiples proteínas relacionadas en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Zhang et al., 2016).

Actualmente PEPT1 es una proteína ampliamente estudiada por sus diversos roles fisiopatológicos y potencial terapéutico. No obstante, hallazgos asociados a ciertos aspectos de su expresión, función y papel en enfermedades inflamatorias encontrados en la literatura siguen siendo contradictorios. Diversos estudios señalan que, además de su expresión en células epiteliales de intestino delgado, PEPT1 se encuentra expresado en bajas o nulas cantidades en intestino grueso, riñón, páncreas, ducto biliar y células del sistema inmune directamente relacionadas a la lámina propia en intestino grueso e intestino delgado (Zhang et al., 2016), donde podría estar involucrado en la captación de péptidos bacterianos durante inflamación intestinal (Ayyadurai et al., 2013). Contrario a múltiples estudios, que han encontrado baja o nula expresión de PEPT1 en colon sano en ratones, ratas y humanos, además de que su actividad funcional es incierta (Spanier & Rohm, 2018), un estudio dirigido por Wuensch et al. en 2013 mencionan que PEPT1 se encuentra expresado de manera normal en la zona media y distal de colon, con una baja expresión de ARNm y nula presencia de proteína. Estos autores igualmente reportaron que la proteína se encuentra activa en colon, principalmente involucrada en la absorción de agua. Aunque no lograron demostrar la presencia de la proteína PEPT1 en lámina propia de tejido intestinal, reportaron una nula relación entre la expresión de PEPT1 en inflamación intestinal y la susceptibilidad o protección a la misma (Wuensch et al., 2013, 2014). Por otro lado, algunos autores han sugerido que estas diferencias se puede atribuir a variaciones en la preparación de la muestra, fuente, especies y especificidad del anticuerpo utilizado (Spanier & Rohm, 2018).

Diversos factores pueden afectar la expresión, localización y función de PEPT1 (Spanier & Rohm, 2018). Recientemente se ha relacionado la expresión inducida de PEPT1 con la actividad transcripcional de PPAR $\alpha$ , un receptor nuclear con afinidad a numerosos ligandos de ácidos grasos poliinsaturados involucrados en numerosos

procesos fisiológicos como metabolismo energético, esteatosis hepática, inflamación, entre otros (Okamura et al., 2014). Se ha demostrado que este receptor, así como sus otras dos de sus isoformas (PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ ), modulan su actividad transcripcional tras su interacción con moléculas cannabinoides endógenas, sintéticas y derivadas de plantas (fitocannabinoides) (Figura 1) (Iannotti & Vitale, 2021).

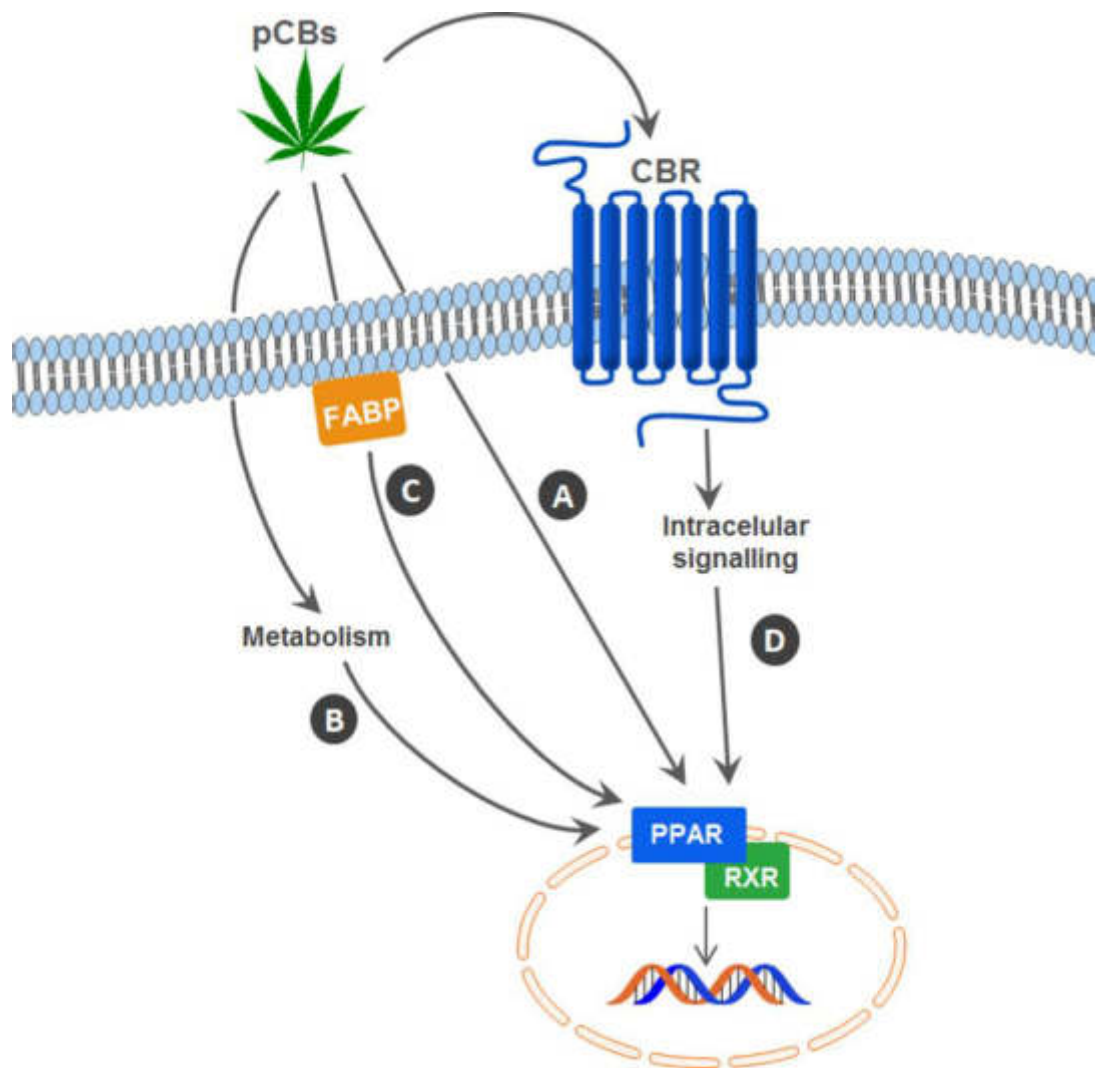


Figura 1: Mecanismos potenciales de las interacciones PPAR-fitocannabinoides (pCBs): A) Unión directa de los fitocannabinoides a estos receptores nucleares; B) Posible conversión de fitocannabinoides a metabolitos que pudiesen activar PPARs; C) Transporte de fitocannabinoides al núcleo por FABPs (proteínas de unión a ácidos grasos); D) Otra posibilidad es que los fitocannabinoides modulen la señalización por receptores cannabinoides (CBRs) activando vías de señalización intracelulares que conlleven a la activación de PPARs. Traducido y adaptado de Morales et al., 2017.

### 2.5.1. PEPT1 en inflamación intestinal.

El rol de PEPT1 en la EII ha sido ampliamente estudiado en diversos modelos relacionados a EII con resultados contradictorios. Se ha señalado que PEPT1 puede actuar como un transportador de los péptidos bacterianos fMLP, tri-DAP y MDP. Este último es reconocido por NOD2 (dominio de oligomerización por unión de nucleótidos), un PRR (receptor de reconocimiento de patrones) que induce una respuesta proinflamatoria tisular, lo que asocia a PEPT1 con la respuesta inmune dependiente de NOD2 (Wuensch et al., 2014). Esta asociación de PEPT1 con la respuesta inmune asociada a NOD2 concordaría con la expresión de PEPT1 en intestino. Los patrones de distribución de péptidos bacterianos en intestino concuerdan con los de la expresión de PEPT1 para limitar su contacto con éstos. La absorción de fMLP en cultivo de células epiteliales de colon aumentó la expresión de moléculas de MHC-I, lo que podría hacer a las células epiteliales de colon más sensibles a los productos bacterianos y a la activación de vías proinflamatorias (Ingersoll et al., 2012). Esto último es base para el papel de PEPT1 en las EIIs, según diversos autores. Algunos estudios han descrito la expresión inducida de PEPT1 en colon debido a condiciones de inflamación crónica como la EII (Adibi, 2003; Ingersoll et al., 2012; Ayyadurai et al., 2013; Viennois et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Se han desarrollado diversos modelos de EII que mimetizan características de las diferentes presentaciones de la enfermedad. En un modelo de inflamación en ratas Wistar inducido por LPS intraperitoneal se encontraron niveles de ARNm y proteína PEPT1 reducidos en yeyuno e íleon (Shu et al., 2002). Sin embargo, en este estudio no se analizaron los niveles de proteína o ARNm en colon o su actividad funcional. En ratones KO para IL-10  $-/-$  como modelo de colitis espontánea, se observaron niveles aumentados de PEPT1 en colon (Chen et al., 2010). En ratones C57/BL6 tratados con TNF- $\alpha$  para inducir inflamación intestinal, se observaron niveles elevados de proteína y en la función de PEPT1 en colon proximal y distal, pero no de ARNm (Vavricka et al., 2006). Asociado a esto, diversos estudios en tejido de colon de pacientes humanos con EII reportan la expresión inducida de PEPT1 en este tejido (Wang et al., 2017). Resultados contradictorios han sido reportados por Wuensch et al. (2014). En este estudio se utilizaron varios modelos relacionados a EII: como los modelos murinos de inflamación intestinal crónica espontánea Tnf  $\Delta^{ARE}/WT$ , IL-10  $-/-$ , IL-10X $Tlr2^{-/-}$ , IL-10X $Tlr4^{-/-}$ ; y los modelos murinos de colitis inducida por DSS y TNBS en ratones WT

y PEPT1<sup>-/-</sup>; finalmente, se analizaron muestras tisulares de intestino humano de pacientes diagnosticados con EII. Contrario a numerosos estudios anteriores, los autores reportan que en los modelos de DSS y TNBS en ratones WT y PEPT1<sup>-/-</sup> observaron signos de colitis similares, independientemente de la expresión de PEPT1. Los ratones PEPT1<sup>-/-</sup> no mostraron resistencia o susceptibilidad alterada a la inflamación por DSS. Por otro lado, en los modelos de TNBS no se evidenciaron cambios en la expresión de PEPT1, a diferencia de los ratones con colitis inducida por DSS en donde observaron niveles inferiores de PEPT1 en colon distal. En el resto de los modelos murinos se observaron niveles significativamente reducidos de ARNm y proteína PEPT1 en colon. Los autores concluyeron que no hay aumentos de PEPT1 en estos modelos de EII o muestras humanas de EII y que encontraron niveles significativamente reducidos de la PEPT1 en todos los casos. Los modelos PEPT1<sup>-/-</sup> no mostraron susceptibilidad o protección a colitis inducida por DSS o TNBS. En este estudio no se encontró expresión de PEPT1 en lámina propia intestinal. Finalmente, a través de estudios *ex vivo*, los autores no lograron determinar el papel de PEPT1 en la activación inmune proinflamatoria inducida por MDP (muramil dipéptido), un péptido derivado de bacteria con afinidad a ser transportado por PEPT1 (Wuensch et al., 2014). Este único estudio contradice numerosos hallazgos reportados anteriormente, por lo que PEPT1 aún requiere un análisis más exhaustivo entorno a su expresión, regulación, función y papel en EIIs. Interesantemente, la expresión de PEPT1 y sus cambios funcionales no han sido investigados en animales domésticos con inflamación intestinal crónica.

## **2.6. eCBoma y fCBs en intestino.**

Numerosos componentes de la eCBoma se encuentran involucrados en la homeostasis intestinal en diferentes niveles como en el control de la motilidad, sensibilidad visceral, inflamación y diversos cuadros fisiopatológicos (Pesce et al., 2017). Además, se ha señalado que las interacciones del sistema endocannabinoide (endocannabinoidoma) con la microbiota intestinal pueden estar involucrados en la homeostasis o alteración de ésta, lo que puede influir en estados patológicos como obesidad, aterosclerosis e hipersensibilidad visceral (Meletis, 2019).

La regulación de este sistema se ha visto alterada en numerosas patologías tanto en humanos como en modelos animales (Toczek & Malinowska, 2018). El uso de cannabinoides se ha propuesto en algunas patologías por propiedades terapéuticas. A pesar de mostrar efectos antiinflamatorios, el uso de THC se ha visto limitado por sus efectos psicoactivos. En contraste, el uso de CBD en conjunto con dosis bajas de THC (que por sí solas serían inefectivas) aumentó su efectividad en un modelo de EII en ratas (Jamontt et al., 2010). También se ha propuesto la inhibición de la degradación de endocannabinoides como un mecanismo de modulación de este sistema a través del aumento del tono de éstos. Interesantemente, cannabinoides como el THC o el CBD pueden aumentar los niveles de endocannabinoides a través de la inhibición de su degradación enzimática, por lo que también ejerce una actividad cannabimimética indirecta (Toczek & Malinowska, 2018).

Hasta la fecha no existe un tratamiento efectivo para la EII. Las terapias farmacológicas convencionales incluyen a los aminosalicilatos, corticoesteroides, tiopurinas, metotrexatos y agentes inhibidores de TNF. Sin embargo, el uso prolongado de estos agentes conlleva a efectos secundarios severos y un impacto perjudicial de la calidad de vida del paciente (Borrelli et al., 2013). Debido a esto surge la necesidad de desarrollar nuevas terapias, menos agresivas para el tratamiento de la EII, como podría ser el uso de cannabinoides.

Los efectos fisiológicos de los cannabinoides han sido objeto de estudio en las últimas décadas por la diversidad de sistemas en los que pueden influir y su papel en numerosas patologías como estimulante del apetito, antiemético, antiespástico, analgésico, antiinflamatorio y antitumoral. Numerosos receptores y ligandos de la eCBoma se encuentran expresados dentro y fuera del TGI, y están asociados a sus funciones. El uso de fitocannabinoides “no psicoactivos” puede modular la función del TGI en la salud y enfermedad, a través de estos componentes (Martínez et al., 2020). Evidencia anecdótica señala a la planta de cannabis (*Cannabis sativa* L.) como una alternativa terapéutica para el tratamiento complementario para el alivio sintomático de EIIs. No obstante, la falta de homogeneidad entre grupos humanos, y otras limitaciones tales como el abuso en el consumo de la planta, entre otras, obstaculizan la obtención de evidencia y el desarrollo de terapias más efectivas (Carvalho et al., 2020). El uso de cannabinoides “no psicoactivos” (o no intoxicantes) como el CBD y el CBG presentan una alternativa terapéutica con un amplio perfil de



seguridad para el tratamiento de este tipo de patologías (Martínez et al., 2020). En las EII, un factor a considerar es la pérdida de permeabilidad intestinal y la traslocación de bacterias o sus productos (como el LPS), que aumentan la severidad del proceso inflamatorio (Schoultz & Keita, 2020). Se ha reportado *in vitro* e *in vivo* el CBD logró prevenir el aumento de la permeabilidad intestinal inducido por inflamación. Sin embargo, los mecanismos de este efecto son muy diversos y algunos aún permanecen inciertos (Couch et al., 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Los mecanismos fisiológicos y moleculares de la Endocannabinoidoma, así como de sus interacciones con los componentes de la planta de *Cannabis sativa* L. presentan un reto en cuanto a las investigaciones que buscan estudiarlos y los tratamientos que buscan justificarlo. Los esfuerzos científicos en todo el mundo, entorno a las propiedades de la planta de Cannabis han avanzado intensamente y se ha llegado a la conclusión de que aún hacen falta estudios para poder integrar adecuadamente los conocimientos en la práctica médica. Algunos cannabinoides como el CBD y CBG se están investigando por el papel que podrían jugar en el tratamiento de enfermedades crónicas como el síndrome de colon irritable, tanto en humanos como en animales. Actualmente se ha estudiado el papel de la proteína intestinal PEPT1 (*SLC15A1*) en la fisiología normal y alterada, particularmente hablando de las EII, aunque los resultados no han sido concluyentes. El presente estudio es el primer esfuerzo científico reportado que busca una relación entre los efectos de un aceite de cannabis de amplio espectro (CBD/AE), PPAR $\alpha$  y PEPT1 en un modelo que mimetiza algunos aspectos de un cuadro inflamatorio intestinal.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La administración de aceite de cannabis (*Cannabis sativa* L.) de amplio espectro rico en Cannabidiol (CBD/AE) contribuye a un aumento en la expresión de PEPT1 (SLC15A1) en intestino de un modelo murino de inflamación intestinal.

## **5. OBJETIVO DEL TRABAJO.**

### **5.1. Objetivo general.**

Determinar los niveles de expresión basal de PEPT1 y PPAR $\alpha$  en epitelio intestinal de ratones BALB/c sanos y con inflamación intestinal inducida por LPS bajo el estímulo de un aceite de cannabis de amplio espectro rico en cannabidiol (CBD/AE).

### **5.2. Objetivos particulares.**

1. Cuantificar la expresión de ARNm de PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino de modelos murinos sanos y con inflamación intestinal bajo el estímulo de CBD/AE.
2. Localizar las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino de modelos murinos sanos y con inflamación intestinal bajo el estímulo del CBD/AE.
3. Cuantificar la densidad integrada PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino de modelos murinos sanos y con inflamación intestinal bajo el estímulo del CBD/AE.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Lugar de estudio.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), en conjunto con el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina (FacMed), ambas instituciones pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

### 6.2. Aceite de cannabis de amplio espectro rico en Cannabidiol (CBD/AE).

El CBD/AE (Tabla 3) fue proporcionado por ICAN y (Botica)<sup>n</sup> (CDMX, México) a una concentración de 100 mg/mL de Cannabidiol (Certificado de análisis de Reference Labs #4146-0011: Report ID: 3842) (Anexo 11.4) y se utilizó como vehículo aceite de semilla de uva.

Tabla 3: Fitocannabinoides contenidos en el CBD/AE.

Cannabinoides	% por materia seca	mg/g
CBDA	LOQ	LOQ
CBD	97.87	978.7
CBDV	0.6	6
THCA	LOQ	LOQ
$\Delta$ 9-THC	LOQ	LOQ
$\Delta$ 8-THC	LOQ	LOQ
CBGA	LOQ	LOQ
CBG	1.61	16.1
CBN	LOQ	LOQ
CBC	LOQ	LOQ
Humedad %	0.00	
Total	>99.99	995.40

LOQ se define como menor a 0.2% por peso y 2.0 mg/g.

### 6.3. Animales de experimentación.

Se utilizaron 24 ratones macho de la cepa BALB/c de 25g de peso, de entre 8 y 11 semanas, obtenidos de Tetrarium S.A. de C.V. y mantenidos bajo condiciones normales durante 5 días en periodo de adaptación a 25°C con una humedad relativa de 40 – 60% y con ciclos de luz/obscuridad de 12 horas (6 am- 6 pm). Los animales fueron alimentados con alimento estándar para roedores (Nutricubos) y con acceso libre a agua purificada. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados en la FMVZ de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

El protocolo se realizó cumpliendo con los lineamientos estipulados en la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SENASICA). Además de atender las directrices establecidas por el Comité Interno de Bienestar Animal en la Enseñanza e Investigación (CIBAEI) y del Comité de Bioseguridad e Higiene (CBSH) de la FMVZ.

### 6.4. Diseño experimental.

Los animales fueron divididos en dos grupos (n=12) y a su vez, divididos de la siguiente manera con una n de 3 por individuos por grupo (Tabla 4):

Tabla 4: Distribución de grupos experimentales.

Grupo (n=3)	Tratamientos
1	CBD/AE
2	AU
3	AI
4	ST*
5	LPS-CBD/AE
6	LPS-AU
7	LPS-AI
8	LPS

\*Sin tratamiento.

## **6.5. Inducción del modelo de inflamación por LPS.**

El LPS de *Salmonella typhimurium* (Sigma-aldrich) se diluyó en PBS a una concentración final de 0.05 mg/mL de LPS. La administración se realizó por la vía intraperitoneal a una dosis de 0.1 mg/kg PV durante 5 días basándonos en el trabajo de otros autores (Guo et al., 2015) en un volumen final de 50µl con una jeringa de calibre 31Gx 6 mm. Los animales se colocaron en una posición dorsoventral. Se estiró cuidadosamente el miembro pelviano, extendiendo con los dedos índice y medio la piel de la región abdominal lateral a la línea media, y alternando entre izquierda y derecha durante los 5 días, y se inoculó el contenido de la jeringa.

## **6.6. Tratamientos.**

Dos horas después de la última administración de LPS se realizó el tratamiento con CBD/AE por la vía oral a una dosis de 100 mg/kg PV de CBD. Con una jeringa de 1 mL y un catéter de plástico calibre 22G, se aspiró un volumen de 30 U de aire y posteriormente el aceite CBD/AE (Aprox. 20-30U de volumen). Se colocó al animal en posición dorsoventral, extendiendo cuidadosamente su cuello e introduciendo el catéter en su totalidad por vía esofágica, asegurándonos de no introducirlo por la vía aérea. Por último, se administró lentamente el aceite en su totalidad, seguido del volumen de aire y se colocó de regreso a los animales en su respectivo grupo. Lo mismo se hizo para los tratamientos de aceite de uva (AU) y agua inyectable (AI).

Los animales que no recibieron LPS fueron administrados con su respectivo tratamiento (CBD/AE /AU /AI) de la misma manera que el grupo anterior, utilizando la misma dosis y volumen. Los animales fueron tratados durante 2 días y 3 horas posteriores a la última dosis, y finalmente se realizó la eutanasia.

## **6.7. Tranquilización y sacrificio.**

Los animales se tranquilizaron individualmente exponiéndolos a altas concentraciones de éter por un periodo corto de tiempo (5-7 segundos), en un ambiente ventilado y bien controlado, dentro de un receptáculo con un algodón empapado del agente anestésico.

## **6.8. Toma de muestras.**

Posterior a la eutanasia, se realizó una incisión abdominal en la línea media para exponer cavidad abdominal y órganos para la toma de muestras. Se obtuvieron secciones de intestino delgado e intestino grueso para su almacenaje en paraformaldehído (PFA) (4%), solución de Carnoy y reactivo TRIzol. Los segmentos de intestino delgado correspondían al yeyuno y el intestino grueso se utilizó en su totalidad, evitando utilizar las porciones proximales (2 cm) para la detección de proteína y ARNm.

Para la detección de ARNm de PEPT1, PPAR $\alpha$  y citocinas por PCR cuantitativa (qPCR) se colocaron los segmentos (0.5 cm) de intestino por separado en microtubos Eppendorf® de 1.5 mL con 0.5 mL de reactivo de lisis celular RNAzol®, tiocianato de guanidina (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) y fueron almacenados a -20°C. Los segmentos destinados para el análisis histológico (2cm) e inmunohistoquímica (2cm) se almacenaron en paraformaldehído al 4% amortiguado (PFA) y solución de Carnoy, respectivamente. Se mantuvieron en fijación durante 48 horas a temperatura ambiente para su procesamiento en el Departamento de Histología de la FM de la UANL.

## **6.9. Análisis histológico.**

Las muestras de intestino fijadas en PFA al 4% se parafinaron automáticamente en un equipo de procesamiento de tejidos automático (KD-TS3B, KEDEE, ZHEJIANG JINHUA KEDI INSTRUMENTAL EQUIPMENT CO., LDT, ZJ, China). Los tejidos previamente fueron colocados en los casetes de inclusión, se deshidrataron en una serie de alcoholes de concentración creciente (60, 70, 80, 96% y Absoluto en 3 cambios de este último) durante una hora cada uno. Posteriormente fueron aclaradas con inmersión en xilol durante 1 hora y finalmente una inmersión en parafina caliente durante 1 hora a 52°C. Los tejidos fueron colocados en bloques de parafina en un centro de inclusión de tejidos (KD-BM, ZHEJIANG JINHUA KEDI INSTRUMENTAL EQUIPMENT CO., LDT, ZJ, China) para obtener cortes longitudinales. Se colocaron en una placa fría (KD-BL, ZHEJIANG JINHUA KEDI INSTRUMENTAL EQUIPMENT CO., LDT, ZJ, China) y se realizaron cortes de 4 $\mu$ m de espesor en un microtomo (LEICA RM2235, LEICA BIOSYSTEMS, IL, USA) para posteriormente ser fijados en un portaobjetos por medio de un equipo de baño de



agua (KD-P, ZHEJIANG JINHUA KEDI INSTRUMENTAL EQUIPMENT CO., LDT, ZJ, China) en agua destilada con gelatina. Los cortes destinados a inmunohistoquímica se procesaron de la misma manera, y colocados en portaobjetos previamente tratados con solución de Poli-L-lisina (Sigma-aldrich) en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> al 10% durante 5 minutos, en un baño térmico de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> sin gelatina y se dejaron secar durante toda la noche.

Una vez montados los cortes en el portaobjetos se rehidrataron en series de alcoholes, comenzando por xilol, etanol-xilol, etanol absoluto, etanol al 96%, etanol al 70% y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, para la tinción de Hematoxilina y Eosina, para la evaluación de cambios histológicos entre los grupos; y la histoquímica de Ácido Peryódico de Schiff (PAS), para la evaluación de componentes tisulares ricos en carbohidratos, como las células caliciformes productoras de mucina. Se realizó a su vez un análisis semicuantitativo de las características histológicas de intestino delgado e intestino grueso.

#### **6.10. Análisis semicuantitativo.**

Los cortes de intestino delgado e intestino grueso teñidos con H&E y PAS se observaron al microscopio y se realizó un análisis semicuantitativo de los siguientes aspectos morfológicos: hemorragia, infiltrado celular en lámina propia, células mononucleares, daño a enterocitos, positividad a la tinción de PAS en membrana apical y presencia de células caliciformes.

De cada grupo experimental se analizaron al microscopio 8 campos de cada individuo (n=3) y se evaluaron visualmente con un objetivo de 100X los parámetros anteriormente mencionados. Para dichos parámetros, se asignaron puntuaciones del 1 al 3 dependiendo de su abundancia (o intensidad, para el caso de la positividad a la tinción de PAS en membrana de borde de cepillo), siendo 1: nada abundante o nulo; 2: moderadamente abundante o moderado; y 3: abundante. Finalmente, se promediaron las puntuaciones de cada grupo y se asignaron cruces (+) para el análisis semicuantitativo. Se asignó +: leve o nulo; ++: para moderado; y +++: abundante (Tablas 6 y 7).

## **6.11. Inmunohistoquímica**

Para la localización por la técnica de inmunohistoquímica de las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino delgado y grueso se utilizaron anticuerpos primarios de conejo anti-PEPT1(ab61182) y anti-PPAR $\alpha$  (ab203043) de ratón (Abcam), a una concentración de 1:500 y 1:250 anticuerpo-diluyente, respectivamente; y el *kit Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit* (ab64264), obtenidos del Departamento de Histología de la FM de la UANL.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó de acuerdo con el protocolo utilizado en el Departamento de Histología de la FM, UANL. Las laminillas con los tejidos rehidratados se lavaron en TBS-T durante 5 minutos. La recuperación del antígeno se hizo con TRS precalentado durante 20 minutos a 60-65°C. Se hicieron lavados en TBS-T. El bloqueo de la peroxidasa endógena se hizo añadiendo 30 $\mu$ l de peróxido de hidrogeno al 3% directamente sobre el tejido y en una cámara húmeda durante 10 minutos. Se hicieron lavados en TBS-T. El bloqueo de proteínas se hizo colocando 30 $\mu$ l del bloqueador de proteína del kit directamente sobre el tejido durante 30 minutos en cámara húmeda. Se hicieron lavados con TBS-T y se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Nuevamente se hicieron lavados con TBS-T y se añadieron 30 $\mu$ l de anticuerpo secundario biotinilado sobre el tejido durante 30 minutos en cámara húmeda. Se hicieron lavados en TBS-T y se colocaron 30 $\mu$ l de estreptavidina y se dejaron incubar en cámara humera por 30 minutos. Finalmente se hicieron lavados en TBS-T y se colocaron 20 $\mu$ l del reactivo DAB diluido en relación 1:20 DAB:Sustrato durante 2-5 minutos. Se hicieron lavados con agua destilada y contratinción con hematoxilina de Gill durante 1.5 minutos. Se realizó un lavado con agua corriente y enjuagado con agua destilada y finalmente se deshidrataron con una serie de alcoholes durante 3 minutos al 70%, 96%, etanol absoluto, etanol-xilol (5 minutos) y xilol (5 minutos). Las laminillas se montaron con una gota de Entellan®, se observaron al microscopio de luz y se analizaron utilizando el programa ToupView.

## **6.12. Cuantificación de la Densidad Integrada.**

De los cortes montados se obtuvieron imágenes fotográficas de 8 campos con el objetivo de 100X por laminilla de cada individuo, tanto de intestino delgado como

de intestino grueso. Para la cuantificación, se utilizó la herramienta ‘‘Measure-Integrated Density’’ en el programa Fiji/ImageJ (Rueden et al., 2017). Los resultados de cada individuo se promediaron y los promedios se utilizaron para el análisis estadístico.

### **6.13. Extracción de ARN total.**

Para la extracción de ARN de las muestras de intestino almacenadas en el reactivo de lisis RNAzol<sup>®</sup>, Tiocianato de guanidina (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) se homogeneizaron los tejidos con 0.5mL de reactivo utilizando un homogeneizador de tejidos (Tissue-Tearor. Model 985370. BioSpec Products, Inc., USA) y se realizó la extracción de ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El pellet de ARN se diluyó en agua libre de nucleasas y finalmente se cuantificó (ng/ $\mu$ l) por espectrofotometría (EPOCH, BioTek, Canadá) y se evaluó el rendimiento obtenido por medio de la medida 260/280.

### **6.14. Síntesis de ADN complementario.**

Después de la extracción de ARN total, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit comercial de retrotranscripción ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcription System (Promega<sup>®</sup>, USA). Para cada reacción se hizo una mezcla de 4 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1  $\mu$ l de Oligo (dT)<sub>15</sub>, 1  $\mu$ l de transcriptasa ImProm-II<sup>™</sup>, 1500 ng de template de ARN y se aforó a un volumen final de 20  $\mu$ l con agua libre de nucleasas. Las reacciones se realizaron en microtubos Eppendorf<sup>®</sup> de 200  $\mu$ l. Las muestras se incubaron en un termociclador modelo Veritti<sup>®</sup> (Applied Biosystem<sup>®</sup>, USA) para la síntesis de ADNc. Nuevamente, se cuantificó la muestra final por espectrofotometría (EPOCH, BioTek, Canadá) y los productos resultantes se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **6.15. Diseño de oligonucleótidos.**

El diseño de los oligonucleótidos para la cuantificación de ARNm de las proteínas PEPT1, PPAR $\alpha$ , el gen normalizador de GAPDH; de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$ ; de los receptores TLR2 y TLR4; y del gen normalizador

de B-actina se realizó a partir de la secuencia de ARNm de cada gen, obtenidas en el Genbank (Tabla 5).

Tabla 5: Oligonucleótidos diseñados.

Gen	Numero de acceso	Secuencia
PEPT1	NM_053 079.2	FWD 5'-CGA AGT AAG GCA TAT CCC AAG AG-3'
		PRB 5'-/56-FAM/ TGG CTG GAC /ZEN/ TGG GCT AAA GAG AAA-3'
		REV 5'-TCA CCT TCG TGA CCA TCT TAA TC -3'
PPAR $\alpha$	NM_001 113418.1	FWD 5'-CGG TGT GTA TGA AGC CAT CT-3'
		PRB 5'-/56-FAM/ CAC GAT GCT /ZEN/ GTC CTC CTT GAT GAA CA /3IABkFQ/-3'
		REV 5'-TAA GGA ACT CGC GTG TGA TAA A-3'
GADPH	NM_001 289726.1	FWD 5'-CCT ACT GCT GAC CTT TCT TCT-3'
		PRB 5'-/56-FAM/ AGA CGT GAA /ZEN/ GTT GGT GGT GAC TGC /3IABkFQ/ -3'
		REV 5'-GCC CTG AGG ACG ATA AAC TAT AA-3'
IL-1B	NM_008 361.4	FWD 5'-GGT ACA TCA GCA CCT CAC AA-3'
		REV 5'-TTA GAA ACA GTC CAG CCC ATAC-3'
IL-4	NM_021 283.2	FWD 5'- TTG AGA GAG ATC ATC GGC ATT T-3'
		REV 5'-CTC ACT CTC TGT GGT GTT CTT C-3'
IL-6	NM_031 168.2	FWD 5'-CTT CCA TCC AGT TGC CTT CT-3'
		REV 5'-CTC CGA CTT GTG AAG TGG TAT AG-3'
IL-10	NM_010 548.2	FWD 5'-TTG AAT TCC CTG GGT GAG AAG-3'
		REV 5'-TCC ACT GCC GGT TTA TTT-3'
IFN- $\gamma$	NM_008 337.4	FWD 5'-CTC TTC ATG GCT GTT TCT -3'
		REV 5'-TTC TTC CAC ATC TAT GCC ACT T-3'
TLR2	NM_011 905.3	FWD 5'-GGA AGA CCT TGC TGT TCT CTA C-3'
		REV 5'-CAC TAT CCG GAG GTT GCA TAT C-3'
TLR4	NM_021 297.3	FWD 5'-AGT ATC GAG AGG CTC AGG TAT AG-3'
		REV 5'-TAC AGG ATG CAG GAC AAG TAA TC-3'
$\beta$ -actina	NM_007 393.5	FWD 5'-GAG GTA TCC TGA CCC TGA AGT A-3'
		REV 5'-CAC ACG CAG CTC ATT GTA GA-3'

Para la reacción de qPCR de PEPT1, PPAR $\alpha$  y GADPH, se utilizaron sondas de hidrólisis Taqman y el kit comercial GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega®, USA). La reacción se hizo mezclando 10  $\mu$ l del reactivo GoTaq® Probe qPCR Master Mix (2X), 0.2  $\mu$ l de CXR Reference Dye, 1  $\mu$ l de primers + sonda, 1  $\mu$ l de ADNc (25 ng) y agua libre de nucleasas para obtener un volumen de reacción final de 20  $\mu$ l. Para la reacción de qPCR de citocinas y receptores TLR, se realizó con fluorocromo SYBR Green con el kit comercial GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®, USA). La reacción se hizo mezclando 10  $\mu$ l de GoTaq Master Mix (2x), 0.5  $\mu$ l de primer FWD, 0.5  $\mu$ l de primer REV, 1  $\mu$ l de ADNc (25 ng) y agua libre de nucleasas para obtener un volumen de reacción final de 20  $\mu$ l. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos PCR® Microplate (Axygen SCIENTIFIC®, California USA), cubiertas con film Platemax® UltraClear Sealing Film (Axygen Scientific®, California, USA). Las reacciones se hicieron por triplicado.

#### **6.16. Análisis de datos.**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism Versión 4.0. Para en análisis de expresión génica y densidad integrada se utilizó un ANOVA de una vía con comparación de medias por el test de Bonferroni. Para las comparaciones entre intestino delgado e intestino grueso se utilizó ANOVA de dos vías con comparación de medias por el test de Bonferroni. Se consideró un valor de  $P \leq 0.05$  como significativo.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Modelo de inflamación.**

El modelo de inflamación fue establecido basándonos en el trabajo de otros autores (Guo et al., 2015) y fue validado por medio de un análisis histológico de secciones proximales de intestino delgado y de intestino grueso; y qPCR para análisis de expresión de citocinas pro y antiinflamatorias y receptores TLR2 y TLR4.

#### **7.1.1. Análisis histológico.**

Se realizó un análisis histológico de secciones intestinales haciendo uso de la técnica histológica de Hematoxilina y Eosina e histoquímica de Ácido Peryódico de Schiff en intestino delgado (Figuras 2, 3, 6 y 7) y grueso (Figuras 4, 5, 8 y 9); y se realizó un análisis semicuantitativo de intestino delgado (Tabla 6) y grueso (Tabla 7).

A nivel histológico en intestino delgado, en los grupos tratados con LPS (Figura 3) el principal hallazgo fue el infiltrado de células mononucleares en lámina propia, con menor prominencia en los individuos LPS tratados con CBD/AE. Además, se observó una mayor cantidad de zonas hemorrágicas localizadas. Dentro de estos grupos, el grupo que fue tratado con CBD/AE mostró el menor grado de hemorragia. Los signos de daño a enterocitos no fueron muy prominentes en ninguno de los grupos LPS bajo el presente protocolo. Sin embargo, en éstos se observaron leves signos de extrusión de núcleos celulares a nivel de enterocitos, sin diferencias entre individuos.

En intestino grueso, se observaron resultados similares a nivel de intestino delgado. Los grupos tratados con LPS mostraron mayor grado de infiltrado celular en lámina propia, caracterizado por abundante presencia de células mononucleares, así como un mayor grado de zonas hemorrágicas localizadas. Estos signos de inflamación se observaron reducidos en los grupos LPS tratados con CBD/AE. Por otra parte, en este tejido el daño a enterocitos fue bajo en todos los grupos.

En la tinción de PAS para la evaluación de la positividad a compuestos ricos en hidrocarburos, como el glucocáliz en la membrana apical de enterocitos y en células caliciformes no se observaron cambios muy prominentes entre los grupos. Tanto en intestino delgado (Figuras 6 y 7) e intestino grueso (Figuras 8 y 9) se observó una leve

disminución de la positividad PAS en membrana apical de enterocitos en dónde solo se observó aumentada en intestino grueso del grupo LPS tratado con CBD/AE.

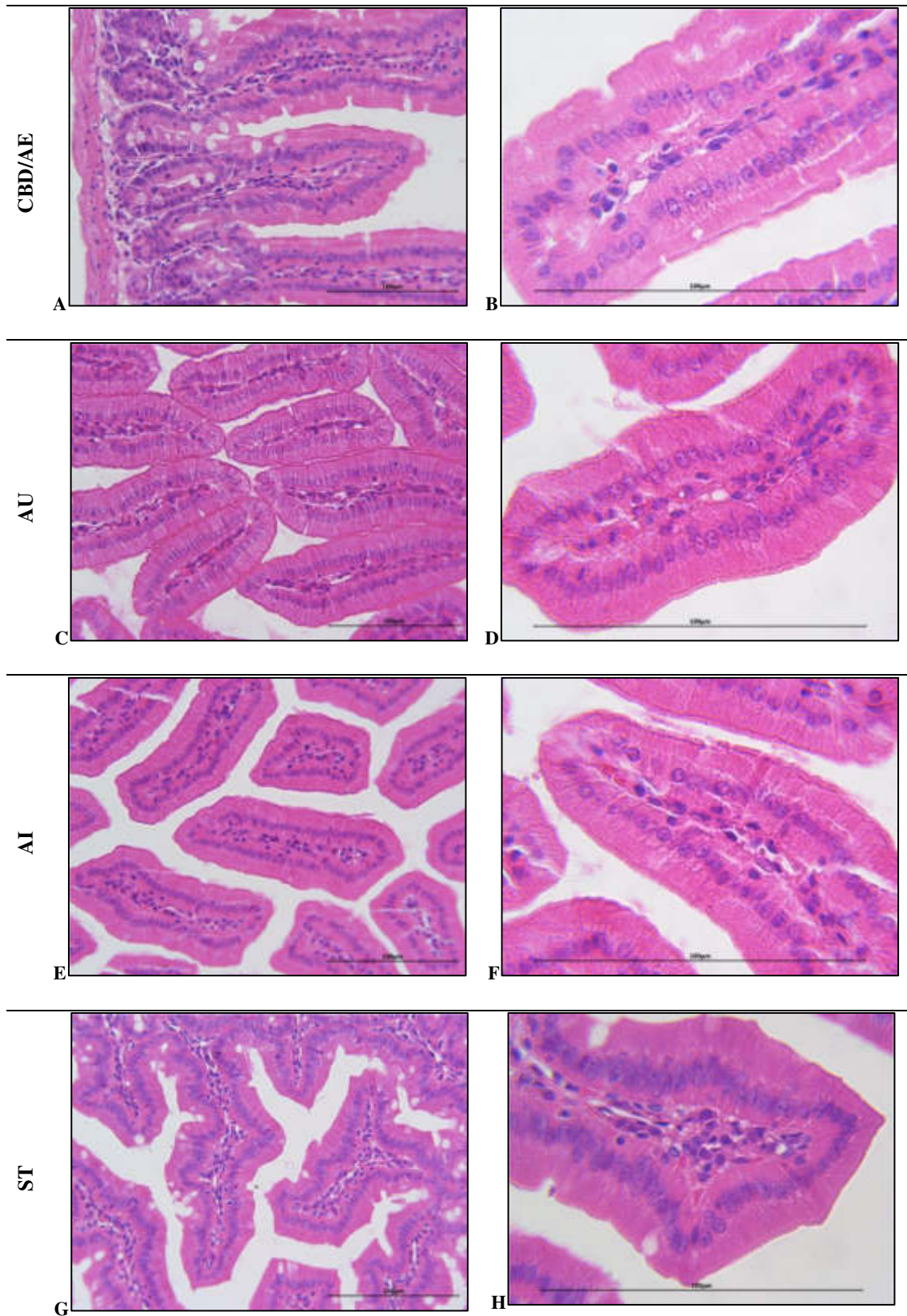


Figura 2: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino delgado de ratones BALB/c, empleando tinción H&E. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. No se observan diferencias entre los grupos sanos.



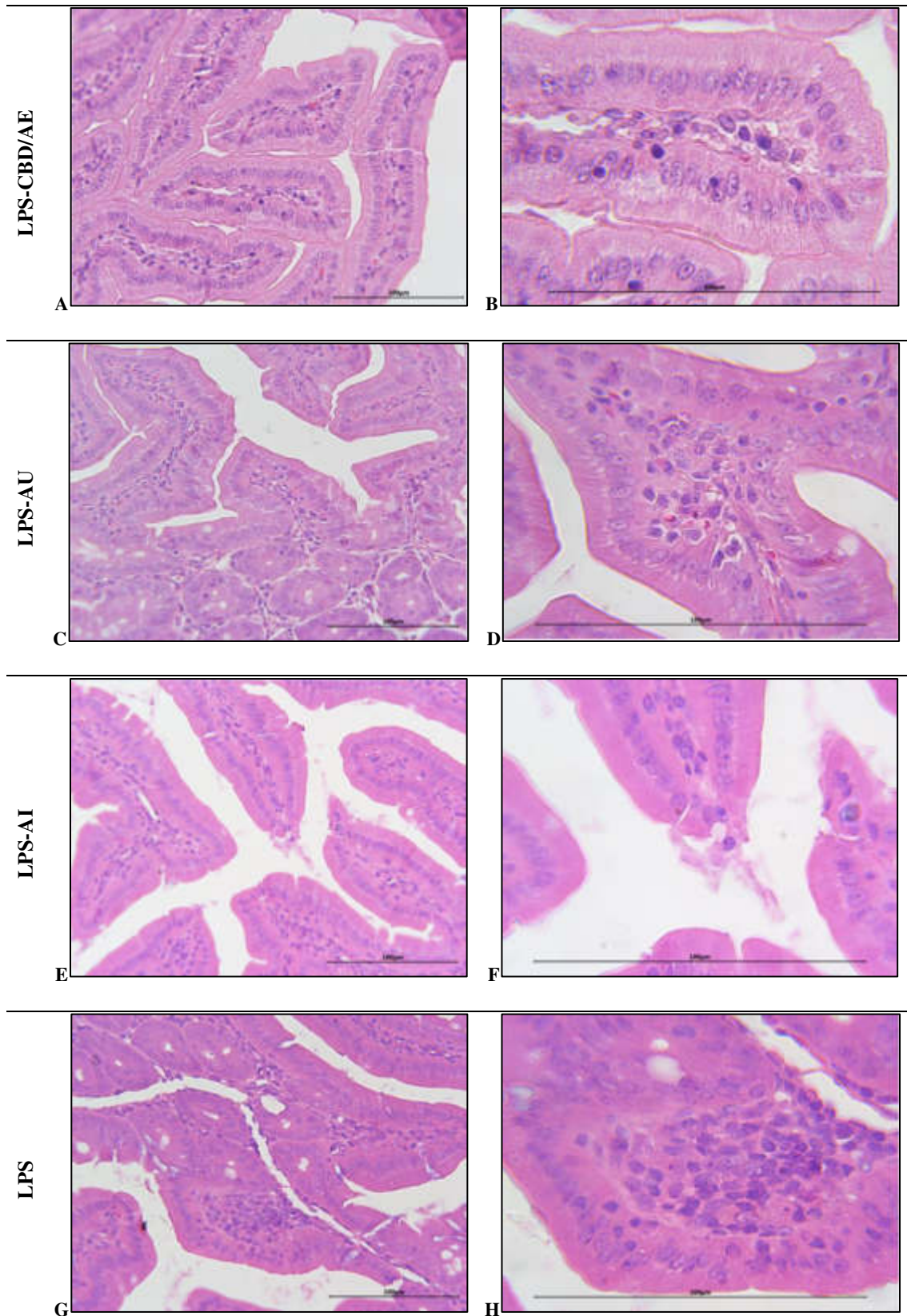


Figura 3: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino delgado de ratones BALB/c como modelo de inflamación, empleando tinción H&E. Las imágenes A, C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. Principlamente se observa el aumento en la cantidad de infiltrado celular en la lámina propia

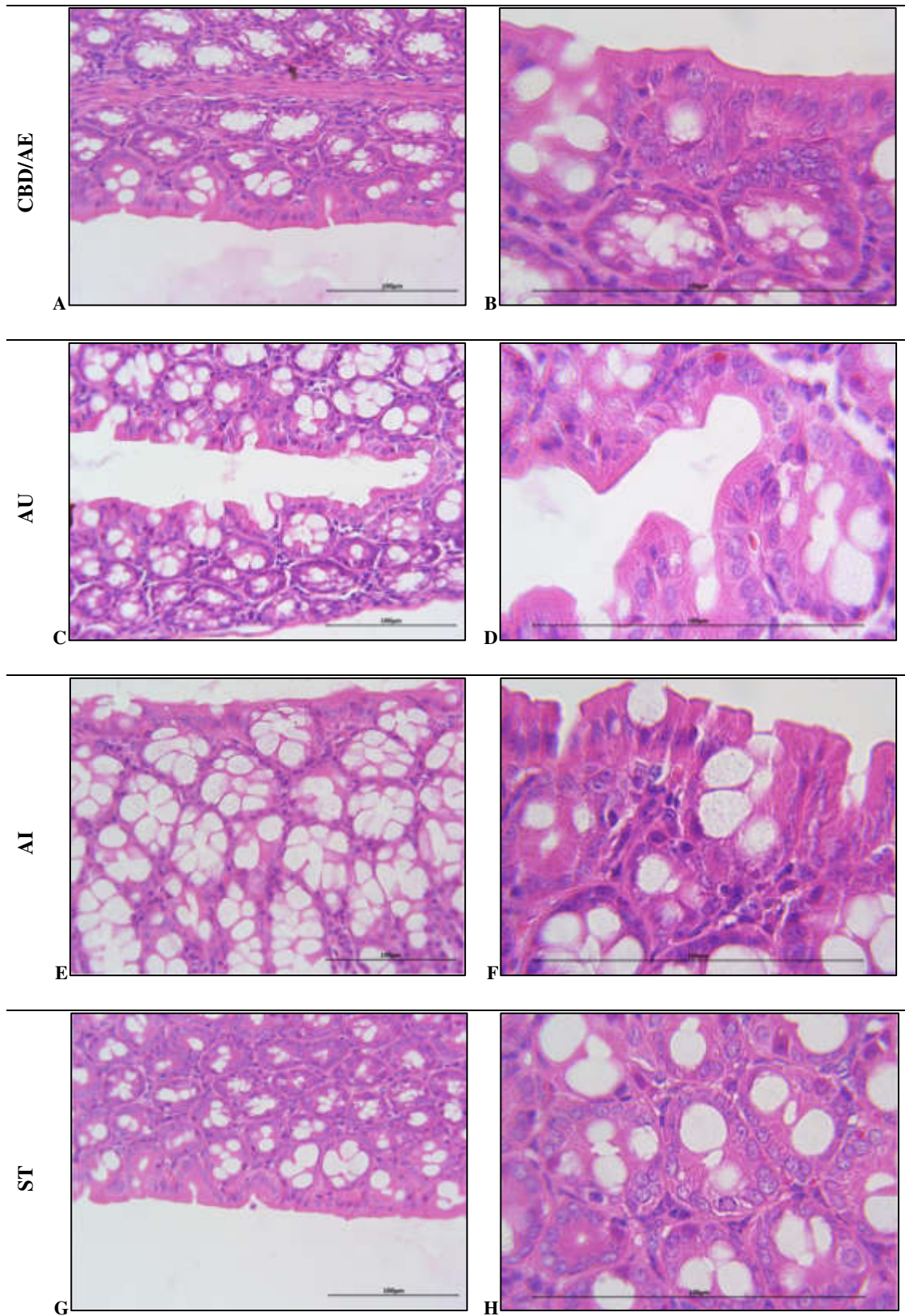


Figura 4: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino grueso de ratones BALB/c, empleando tinción H&E. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100 µm. No se observan diferencias entre los grupos sanos.

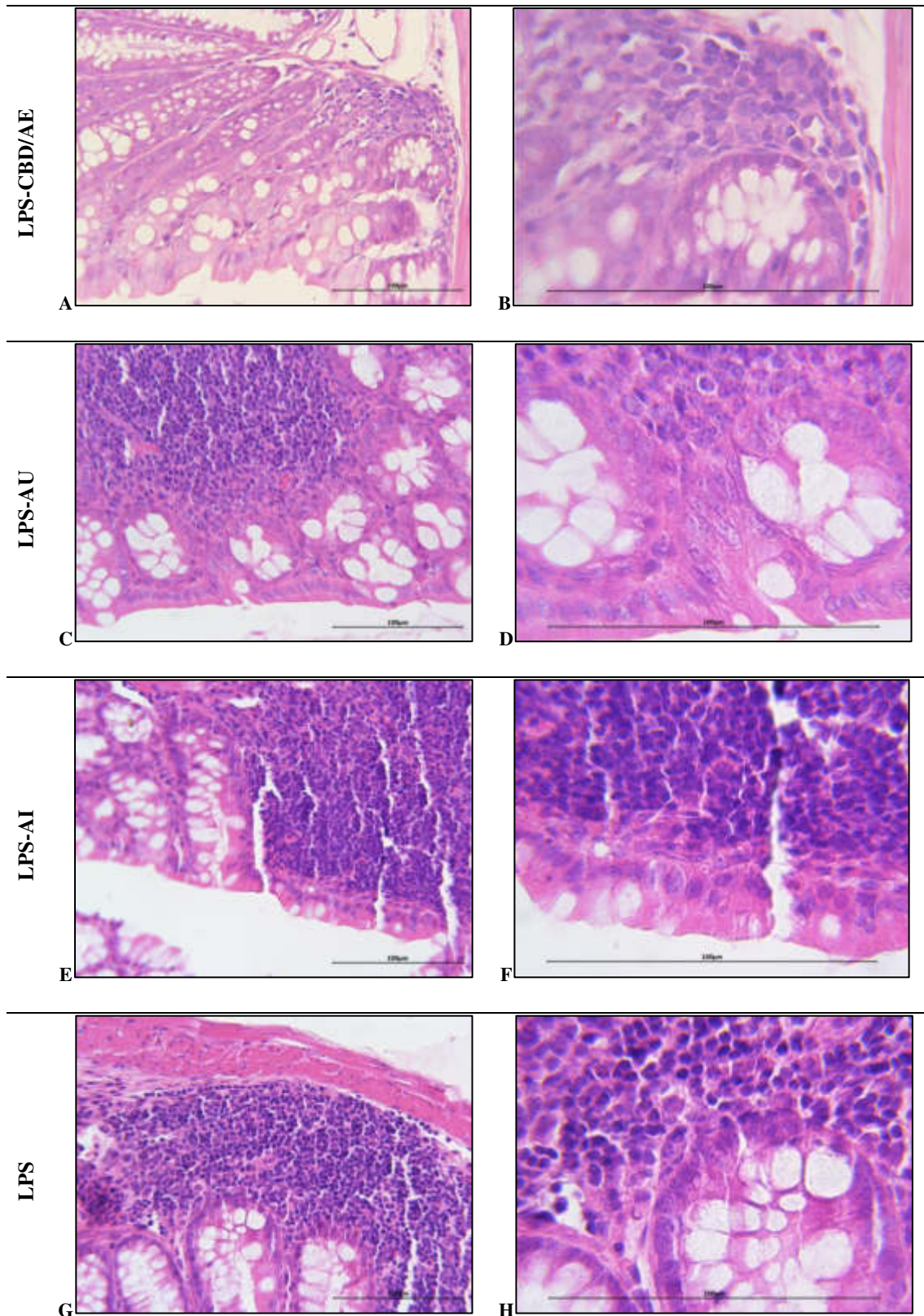


Figura 5: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino grueso de ratones BALB/c como modelo de inflamación, empleando tinción H&E. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. Se observa mayor cantidad de infiltrado celular en los grupos LPS, y menor en el grupo LPS-CBD/AE.

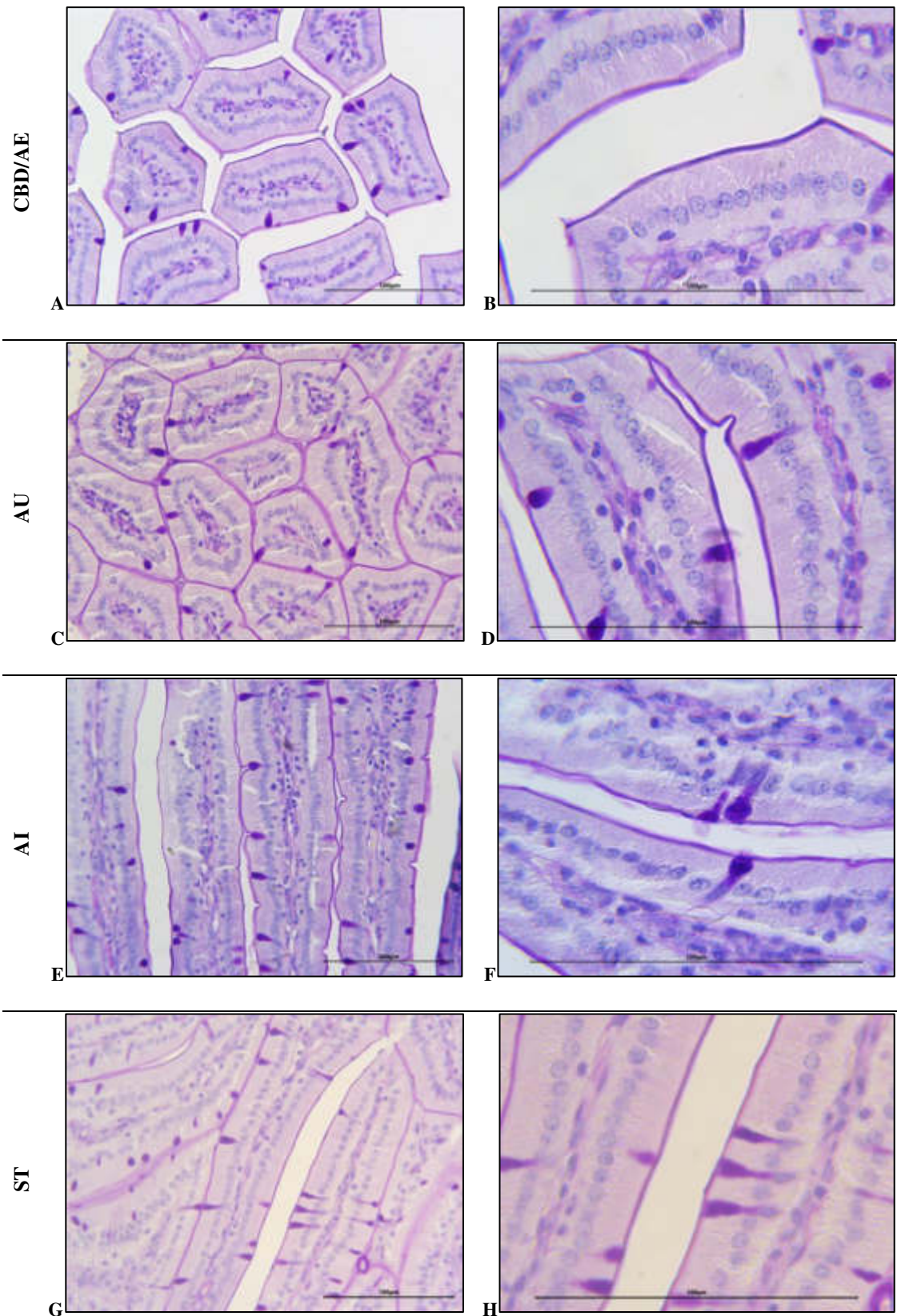


Figura 6: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino delgado de ratones BALB/c, empleando tinción PAS. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. La positividad PAS se mantuvo igual entre todos los grupos sanos.

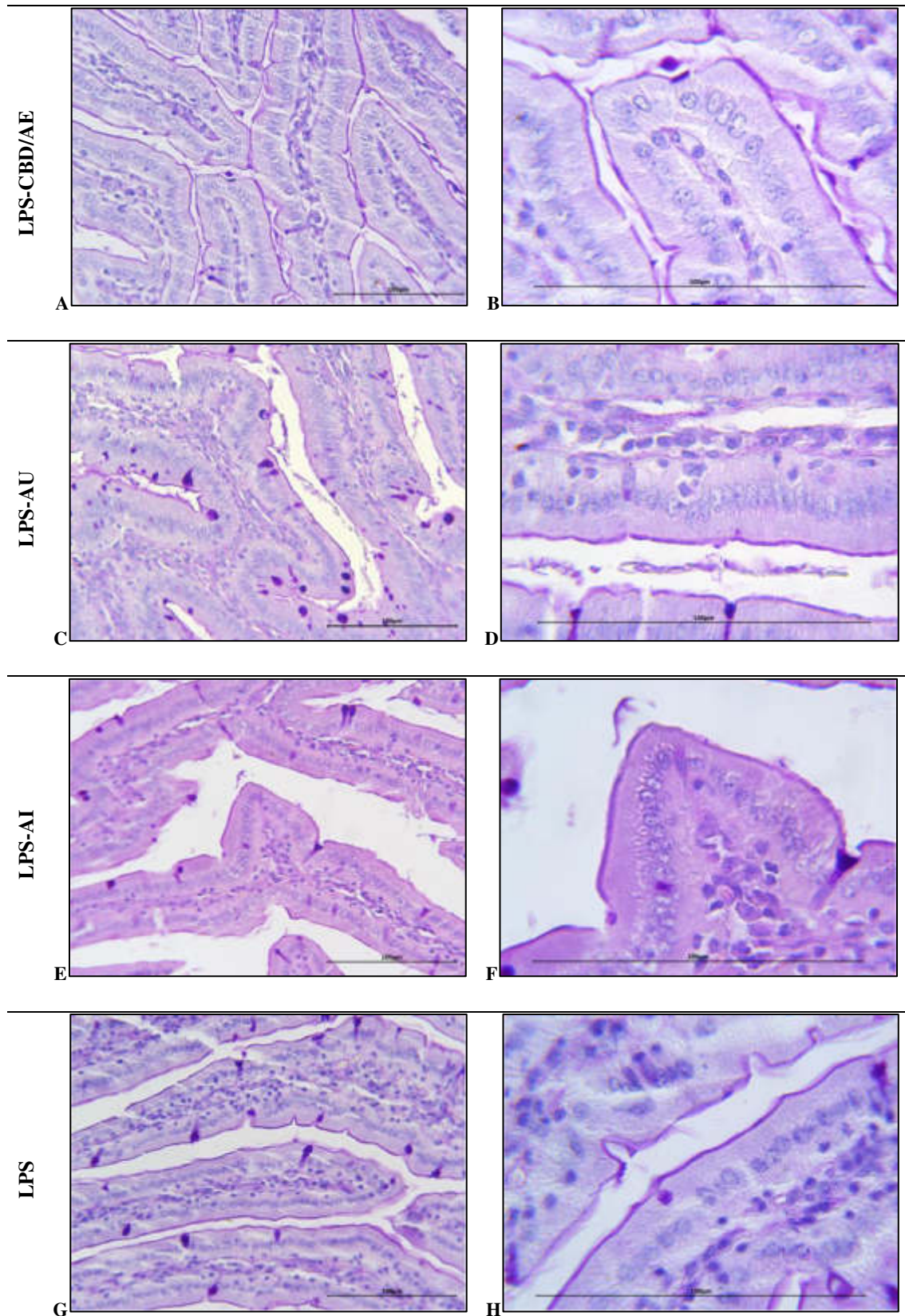


Figura 7: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino delgado de ratones BALB/c como modelo de inflamación, empleando tinción PAS. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. La positividad PAS fue ligeramente menor entre los grupos tratados con LPS.

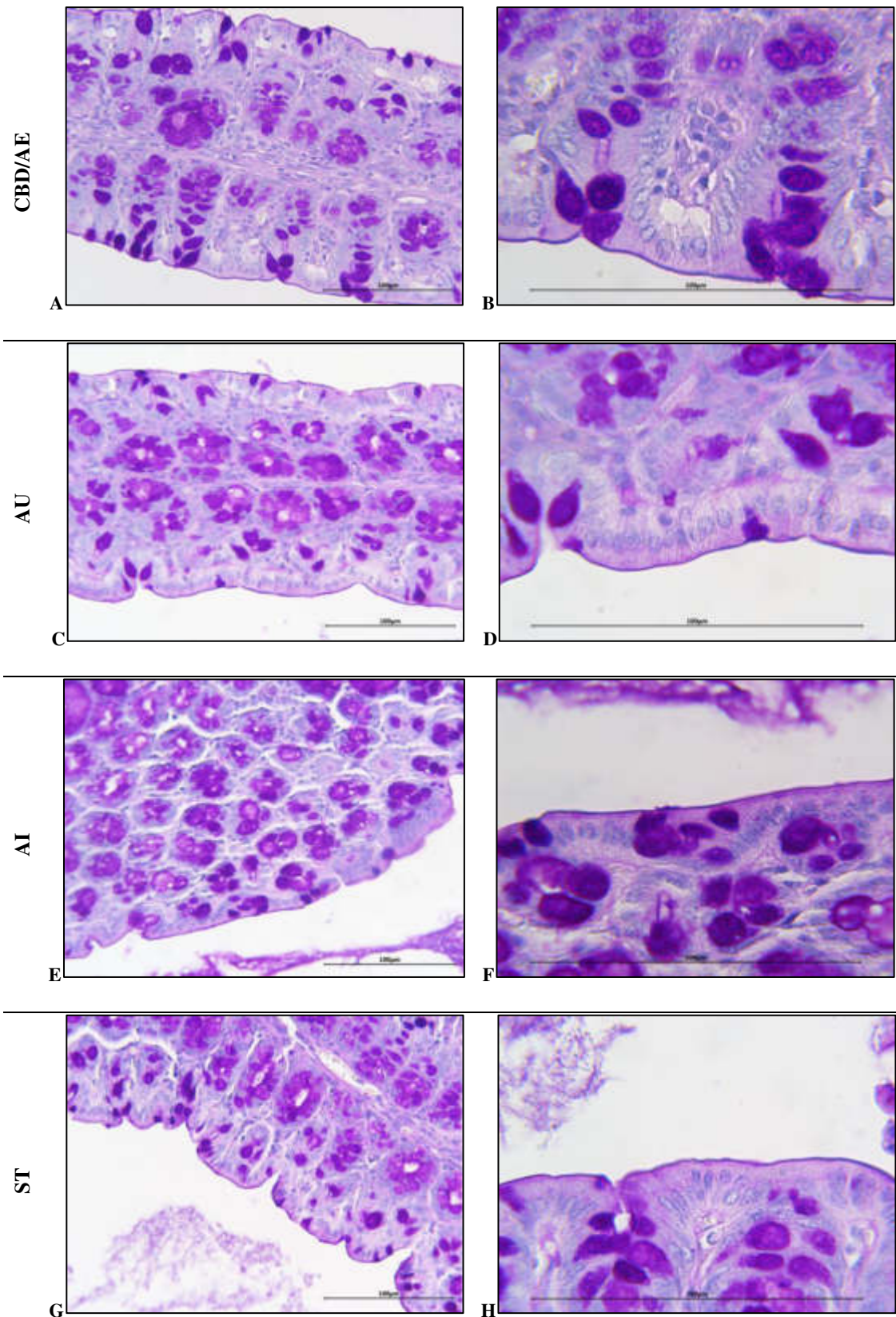


Figura 8: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino grueso de ratones BALB/c, empleando tinción PAS. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. Se observó una positividad PAS igual entre todos los grupos.

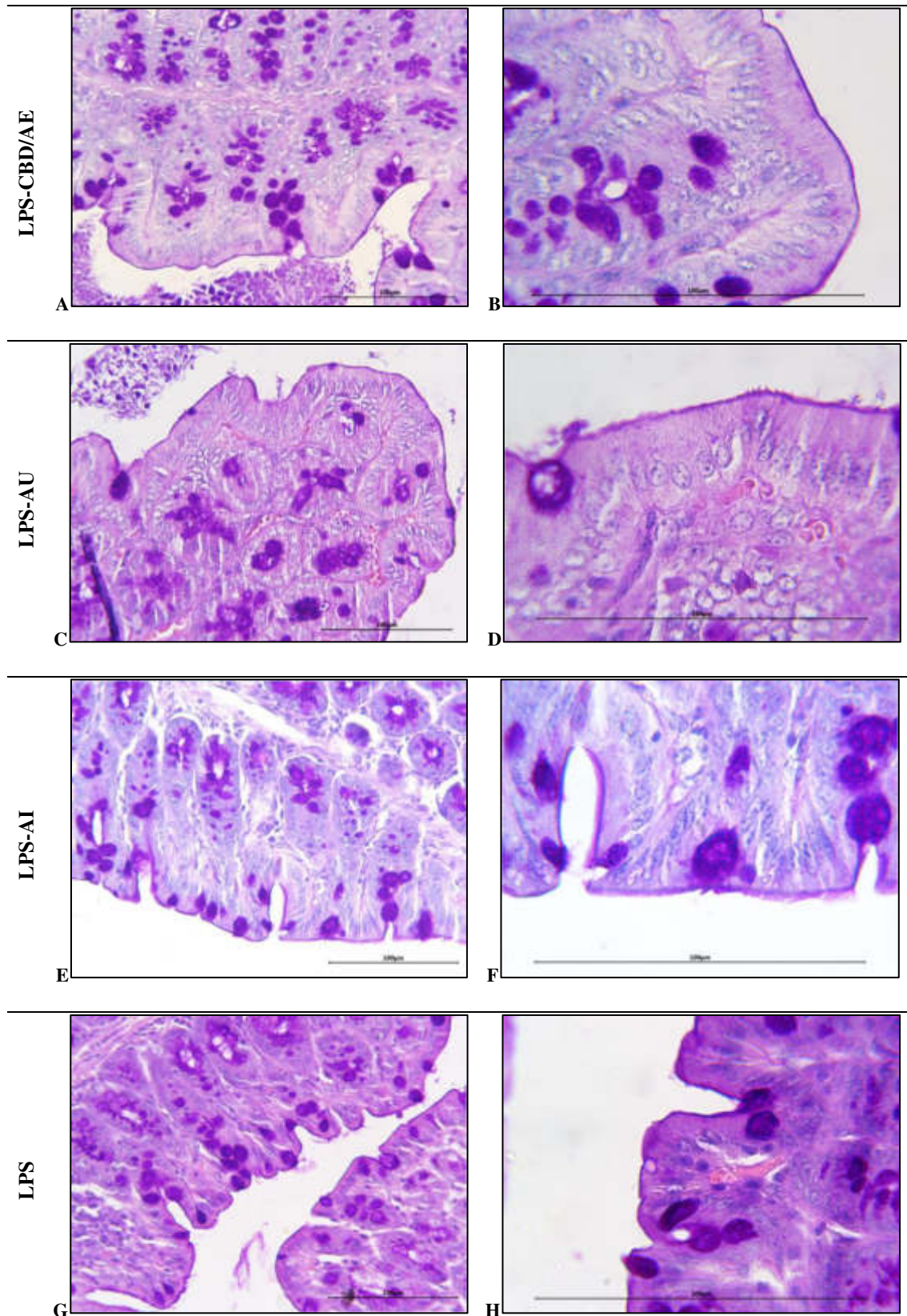


Figura 9: Efecto de los diferentes tratamientos en intestino grueso de ratones BALB/c como modelo de inflamación, empleando tinción PAS. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100 μm. Se observó una leve disminución de la positividad pas en los grupos LPS-AU, LPS-AI y LPS.

### 7.1.2. Análisis semicuantitativo de inflamación en intestino delgado.

Tabla 6: Análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos en intestino delgado de ratones BALB/c.

<b>Intestino Delgado</b>	<b>LPS- CBD/AE</b>	<b>LPS- AU</b>	<b>LPS- AI</b>	<b>LPS</b>	<b>CBD/AE</b>	<b>AU</b>	<b>AI</b>	<b>ST</b>
<b>Hemorragia</b>	+	++	++	++	+	+	+	+
<b>Infiltrado celular en lámina propia</b>	++	+++	+++	+++	+	+	++	++
<b>Células mononucleares</b>	++	+++	+++	+++	+	+	+	+
<b>Daño a enterocitos</b>	++	++	++	++	+	+	+	+
<b>Positividad PAS en membrana apical</b>	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<b>Presencia de células caliciformes</b>	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++



### 7.1.3. Análisis semicuantitativo de intestino grueso.

Tabla 7: Análisis semicuantitativo de los cambios morfológicos en intestino grueso de ratones BALB/c.

<b>Intestino Grueso</b>	<b>LPS- CBD/AE</b>	<b>LPS- AU</b>	<b>LPS- AI</b>	<b>LPS</b>	<b>CBD/AE</b>	<b>AU</b>	<b>AI</b>	<b>ST</b>
<b>Hemorragia</b>	++	++	++	++	+	+	+	+
<b>Infiltrado celular en lámina propia</b>	++	+++	+++	+++	+	+	++	++
<b>Células mononucleares</b>	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
<b>Daño a enterocitos</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Positividad PAS en membrana apical</b>	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<b>Presencia de células caliciformes</b>	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++

#### **7.1.4. Expresión de citocinas y receptores TLR.**

Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ ; las citocinas antiinflamatorias IL-10 e IL-4; y receptores TLR2 y TLR4, para determinar el efecto del LPS y el CBD/AE en el proceso inflamatorio de intestino delgado e intestino grueso de ratones BALB/c por medio de la técnica de qPCR y análisis de expresión por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Doble delta Ct).

En intestino delgado, el grupo tratado con LPS mostró los mayores niveles de expresión de las citocinas IL-6 (Figura 10A) e IL-1 $\beta$  (Figura 10B), con diferencias altamente significativas ( $P\leq 0.001$ ) entre éste y los grupos tratados con CBD/AE y LPS-CBD/AE, y sin diferencias entre estos últimos. La expresión de IFN- $\gamma$  (Figura 10C) en intestino delgado mostró diferencias significativas ( $P\leq 0.05$ ) entre los grupos LPS y LPS-CBD/AE, siendo mayor en este último, solo con diferencias numéricas entre éstos últimos.

En análisis de expresión del receptor TLR2 (Figura 10D) mostró aumentar al administrar LPS solo con diferencias significativas entre el grupo LPS-CBD/AE y el grupo CBD/AE ( $P\leq 0.01$ ). Por otra parte, la expresión del receptor TLR4 (Figura 10E) no mostró diferencias estadísticas entre los grupos ( $P> 0.05$ ).

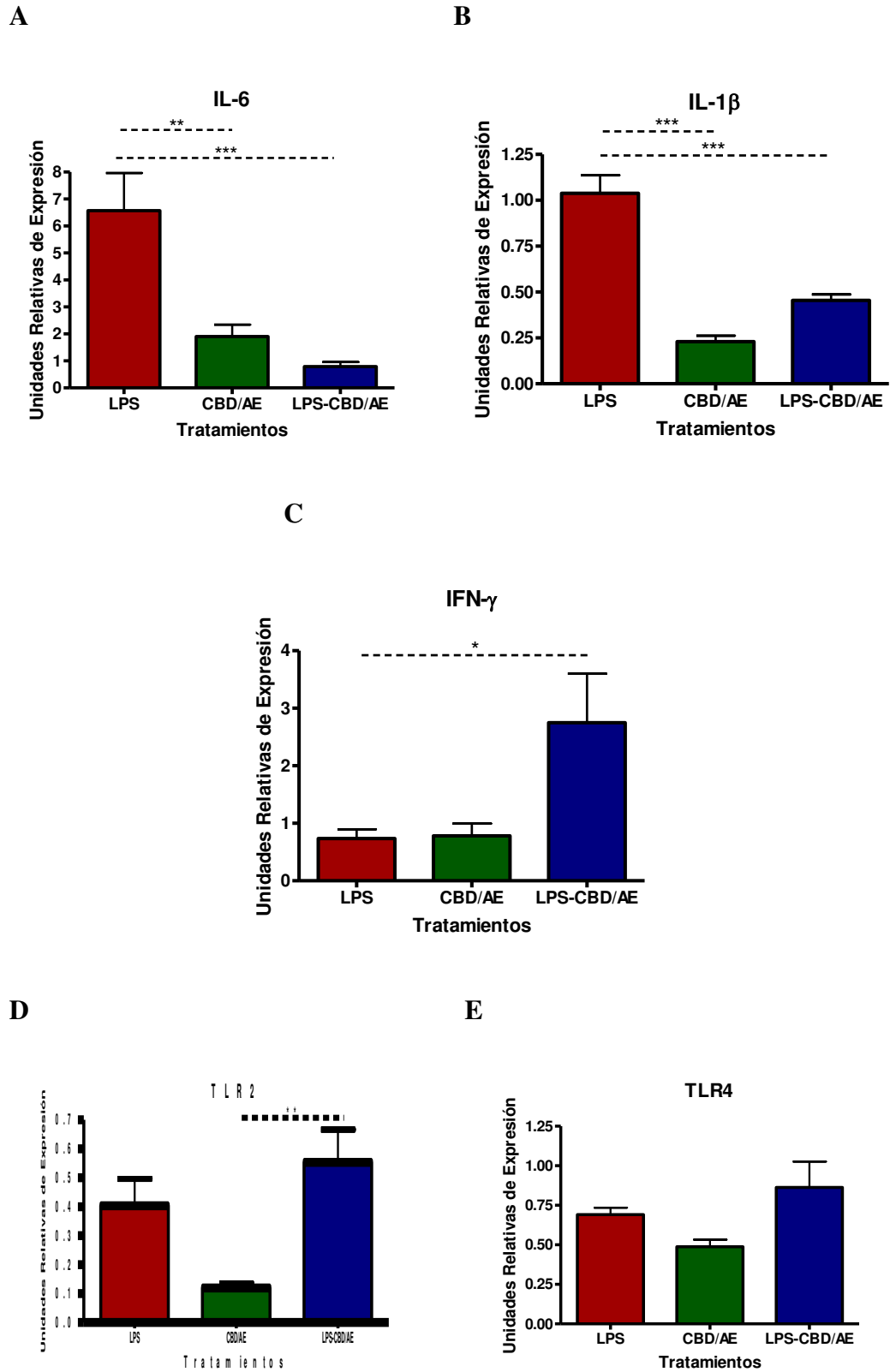
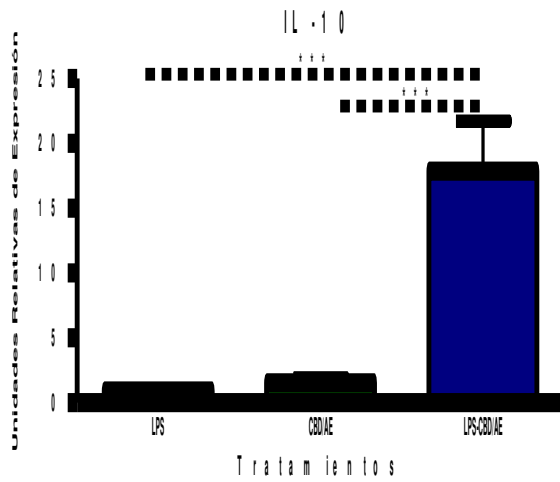


Figura 10: Efecto del CBD/AE en la expresión de citocinas proinflamatorias y receptores TLR2 y TLR4 en intestino delgado de ratones BALB/c ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ). Los datos se presentan como media de cada grupo, las barras indican el error estándar y los asteriscos sobre las columnas indican las diferencias estadísticas. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

En los individuos tratados con LPS las citocinas antiinflamatorias IL-10 (Figura 11A) e IL-4 (Figura 11B) se encontraban en niveles similares de ARNm al compararse con los individuos sanos tratados con CBD/AE ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, éstas se encontraban aumentadas en los individuos con inflamación tratados con CBD/AE (LPS-CBD/AE) ( $P \leq 0.001$ ).

**A**



**B**

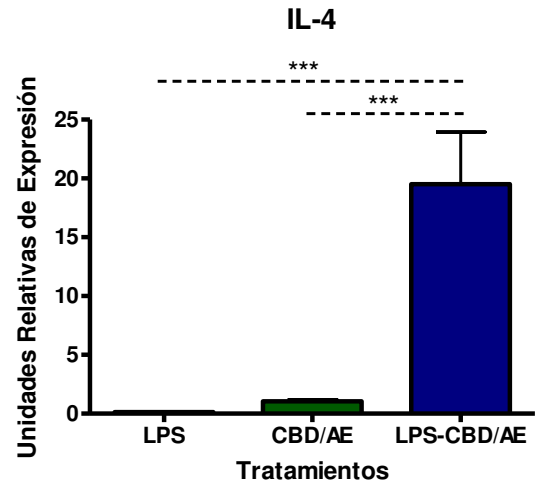


Figura 11. Efecto del CBD/AE en la expresión de citocinas antiinflamatorias en intestino delgado ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Los datos se presentan como media de cada grupo, las barras indican el error estándar y las letras sobre las columnas indican las diferencias estadísticas. \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

En intestino grueso de los grupos tratados con LPS se encontraban mayormente expresadas las citocinas proinflamatorias IL-6 ( $P \leq 0.001$ ), IL-1 $\beta$  ( $P \leq 0.001$ ) e IFN- $\gamma$  ( $P \leq 0.01$ ) (Figura 12). La expresión de ARNm de IL-6 (Figura 12A) en los individuos tratados con CBD/AE fue numéricamente menor que en el grupo tratado con LPS, y se observaron niveles estadísticamente menores ( $P \leq 0.05$ ) de ARNm de IL-6 en los individuos tratados con LPS y CBD/AE (LPS-CBD/AE). En estos dos grupos, la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$  (Figura 12B) fue menor que en el grupo LPS pero iguales entre éstos ( $P \geq 0.05$ ). La expresión de IFN- $\gamma$  (Figura 12C) mostró un patrón similar, siendo mayor en el grupo LPS con diferencia significativa ( $P \leq 0.01$ ) entre este grupo y los grupos CBD/AE y LPS-CBD/AE, siendo estos iguales entre si ( $P \geq 0.05$ ). Finalmente, la expresión de TLR2 (Figura 12D) mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en los grupos LPS y CBD/AE y con el mismo nivel de significancia entre los grupos CBD/AE y LPS-CBD/AE. En intestino grueso, el grupo LPS mostró un mayor nivel de expresión de TLR4 (Figura 12E) al compararse contra los grupos CBD/AE y LPS-CBD/AE con una significancia alta ( $P \leq 0.001$ ).

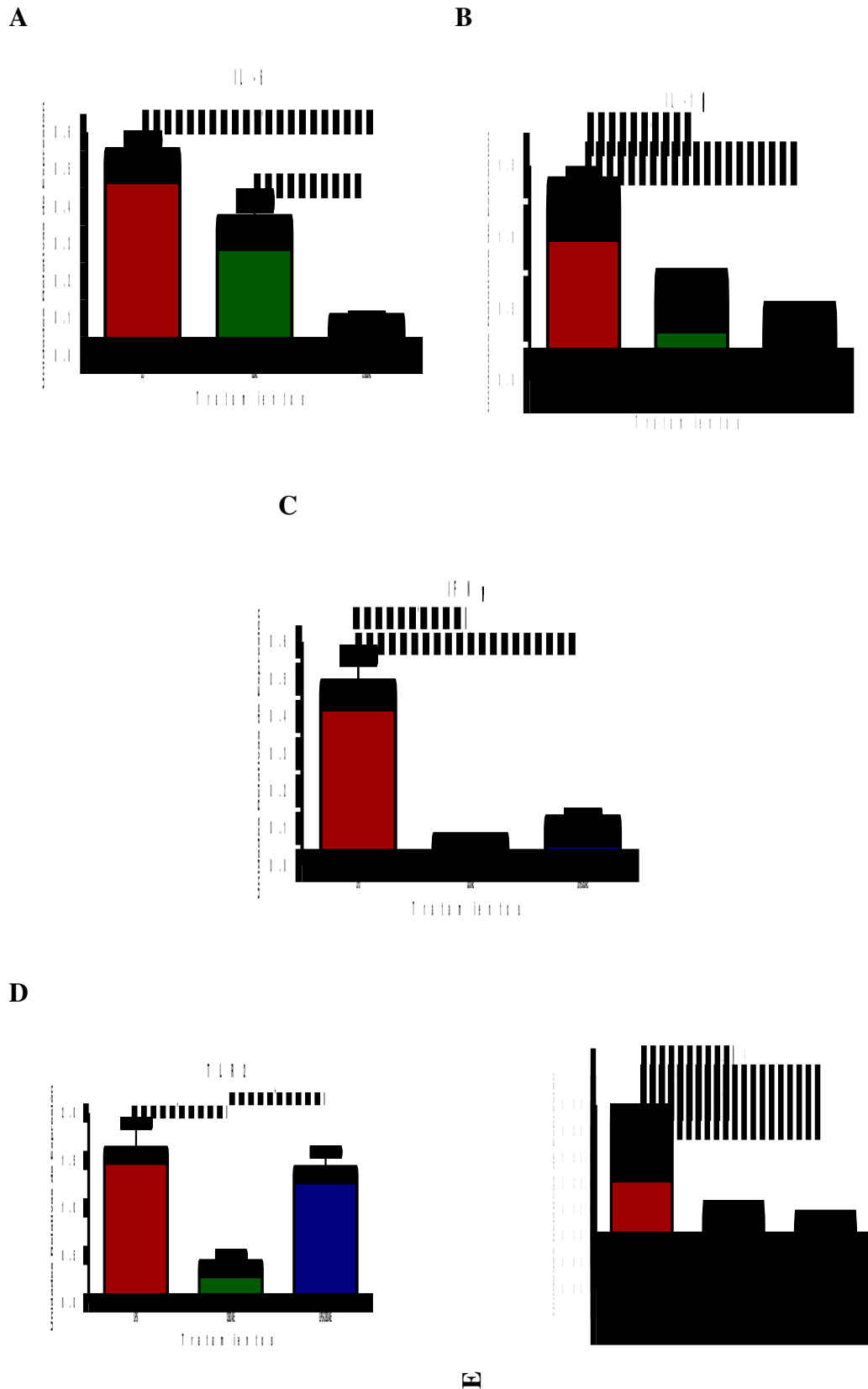


Figura 12: Efecto del CBD/AE en la expresión de citocinas proinflamatorias en intestino grueso ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Los datos se presentan como media de cada grupo, las barras indican el error estándar y las letras sobre las columnas indican las diferencias estadísticas. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

En este tejido, a nivel de citocinas antiinflamatorias (Figura 13), el grupo LPS fue el que menores niveles de ARNm de IL-10 ( $P \leq 0.001$ ) (Figura 13A) a comparación del grupo CBD/AE y LPS-CBD/AE. IL-4 (Figura 13B), por otra parte, solo tuvo diferencias estadísticas entre los grupos LPS y LPS-CBD ( $P \leq 0.001$ ), pero con diferencias numericas totales entre éste y el grupo tratado con CBD/AE.

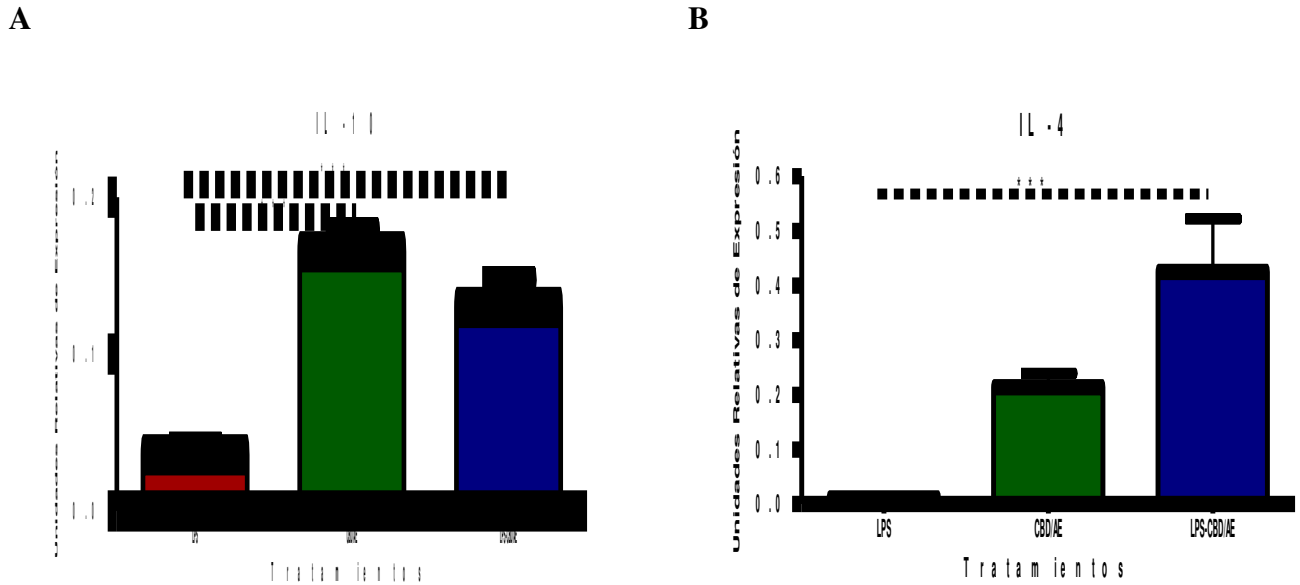


Figura 13: Efecto del CBD/AE en la expresión de citocinas antiinflamatorias en intestino grueso ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Los datos se presentan como media de cada grupo, las barras indican el error estándar y las letras sobre las columnas indican las diferencias estadísticas. \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

## **7.2. Expresión de PEPT1 y PPAR $\alpha$ en intestino.**

El análisis de expresión de las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$  se realizó mediante cuantificación de expresión de ARNm por la técnica de qPCR utilizando sondas de hidrólisis Taqman, localización de proteína por medio de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos primarios policlonales; y finalmente la cuantificación de proteína por densidad integrada por medio del software Image J.

### **7.2.1. PEPT1**

El marcaje de la reacción de PEPT1 en intestino delgado (Figuras 14 y 15) se localizó principalmente a nivel de células relacionadas a la lámina propia intestinal, sin marcaje prominente en membrana de borde de cepillo, y fue muy similar entre todos los grupos sanos. Este marcaje era más evidente en tejidos con mayor infiltración celular en lámina propia intestinal, como en los grupos tratados con LPS, y, tal como se observó a nivel de densidad integrada, éste disminuye al añadir el tratamiento con CBD/AE (Figura 15A y B) al compararse con el resto de los grupos control (Figura 14C, D, E, F, G y H).

En intestino grueso se observó marcaje a la proteína PEPT1 a nivel de citoplasma en células relacionadas a la lámina propia (Figuras 16 y 17). Similar a lo observado en intestino delgado, los aumentos del marcaje se ven relacionados a los aumentos en el infiltrado celular, inducido por la administración de LPS (Figura 17C, D, E, F, G y H).



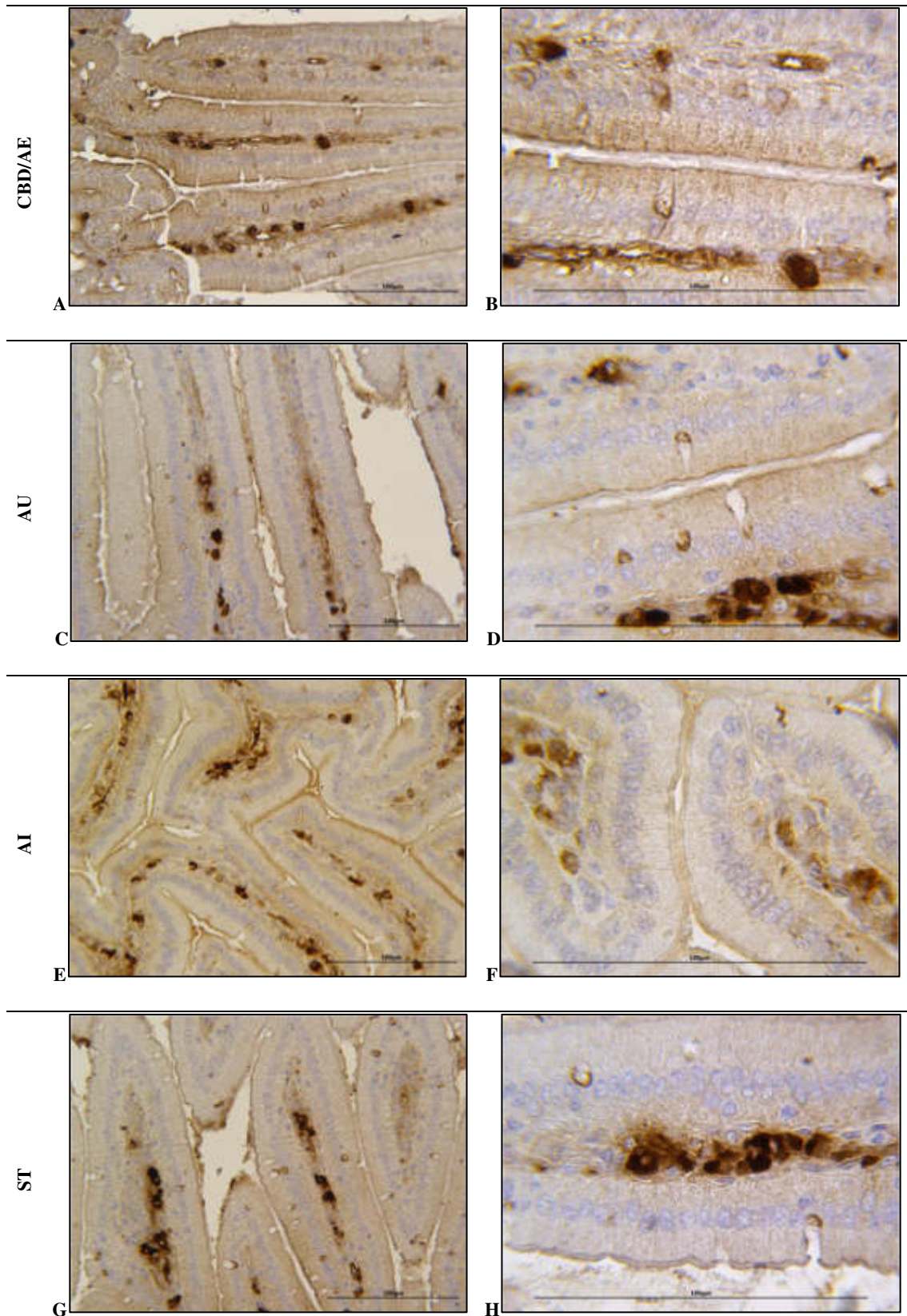


Figura 14: Inmunomarcaje anti-PEPT1 en intestino delgado de ratones BALB/c, mediante la técnica de inmunohistoquímica. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. El principal marcaje anti-PEPT1 se observó a nivel de la lámina propía.

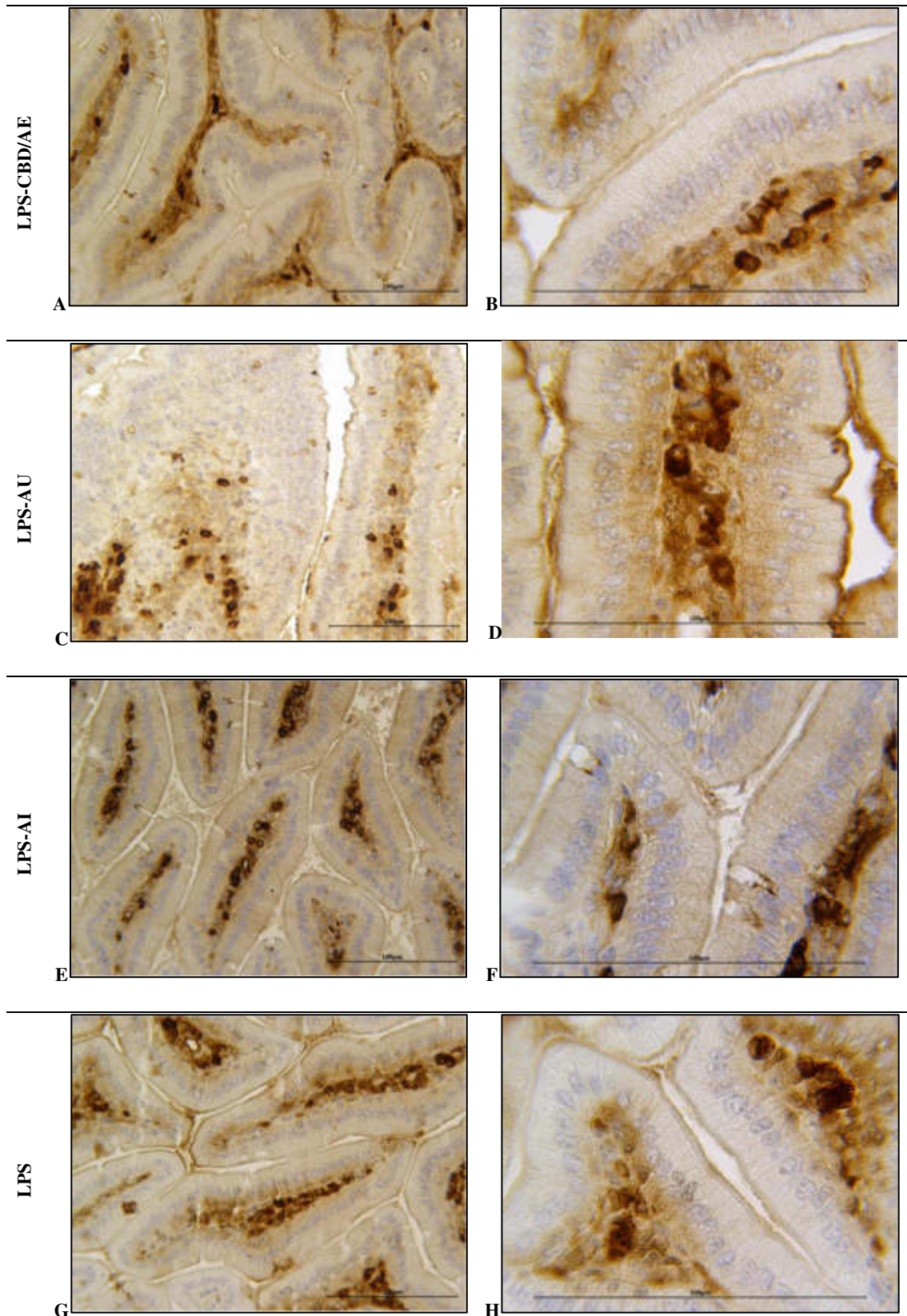


Figura 15: Inmunomarcaje anti-PEPT1 en intestino delgado de ratones BALB/c como modelo de inflamación, mediante la técnica de inmunohistoquímica. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. El marcaje anti-PEPT1 en la lamina propia fue mayor en los grupos LPS.

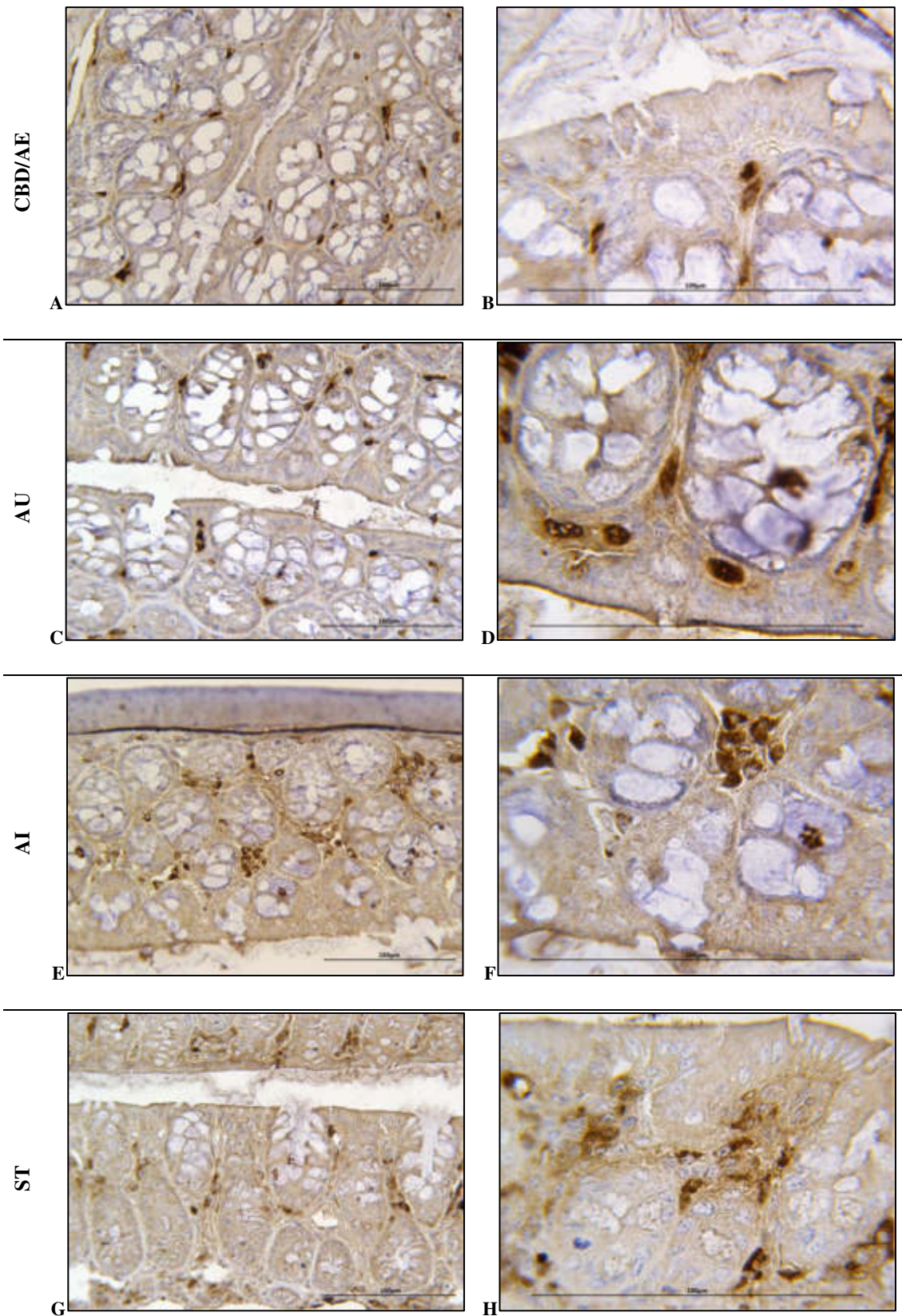


Figura 16: Inmunomarcaje anti-PEPT1 en intestino grueso de ratones BALB/c, mediante la técnica de inmunohistoquímica. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. El principal marcaje anti-PEPT1 se observó a nivel de la lámina propia.

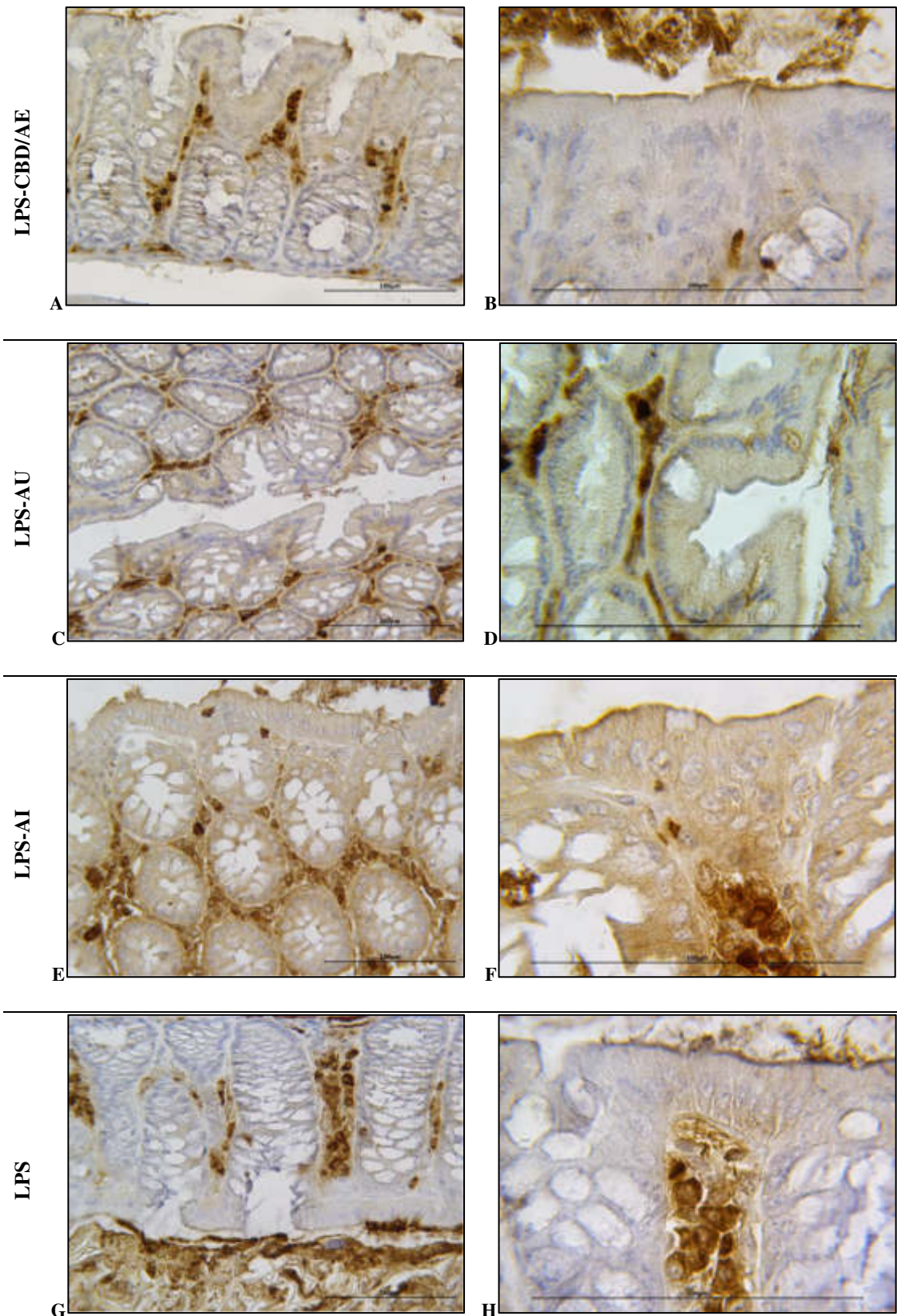


Figura 17: Inmunomarcaje anti-PEPT1 en intestino grueso de ratones BALB/c como modelo de inflamación, mediante la técnica de inmunohistoquímica. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. El marcaje anti-PEPT1 en lámina propia fue mayor en los grupos LPS.

A nivel de ARNm de PEPT1 (Figura 18A) y densidad integrada (Figura 18B) en intestino delgado, el grupo LPS mostró niveles de expresión de PEPT1 mayores que el grupo control tratado con el AU ( $P \leq 0.001$ ). Al administrarse el CBD/AE en los individuos tratados previamente con LPS, la expresión de PEPT1 disminuye significativamente tanto a nivel de ARNm ( $P \leq 0.01$ ) como de proteína en densidad integrada ( $P \leq 0.01$ ). Por otra parte, al administrarse el CBD/AE en los individuos sanos, la expresión de ARNm de PEPT1 en intestino delgado mostró aumentar, a comparación de los grupos tratados con vehículo ( $P \leq 0.01$ ), sin verse reflejado a nivel de proteína, en donde se mantuvo en los mismos niveles que el grupo control AU ( $P > 0.05$ ).

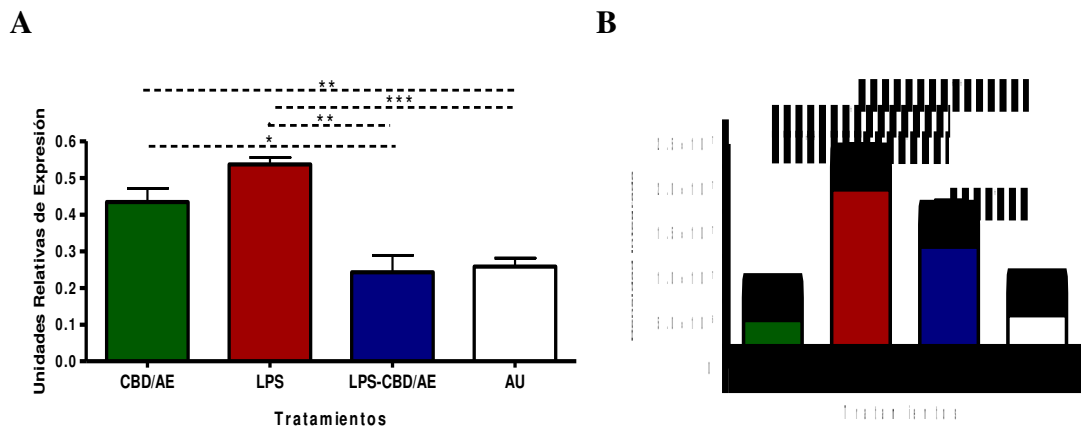


Figura 18: Expresión de ARNm y proteína PEPT1 en intestino delgado de ratones BALB/c. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Se encontraron niveles de ARNm de PEPT1 en intestino grueso de ratones BALB/c independientemente del tratamiento (Figura 19A). La expresión de ARNm, similar al patrón descrito anteriormente en intestino delgado, se encontraba aumentada en los grupos tratados con LPS, a comparación de los grupos control AU ( $P \leq 0.05$ ). La administración de CBD/AE en los grupos sanos y tratados con LPS mostró niveles numéricamente menores de expresión de ARNm de PEPT1, con pocas diferencias estadísticas ( $P \geq 0.05$ ). Sin embargo, el marcaje de la proteína (Figura 14B) mostró disminuciones altamente significativas entre el grupo LPS y los grupos CBD/AE, LPS-CBD/AE y AU ( $P \leq 0.001$ ), y menormente significativas entre los individuos sanos tratados con CBD/AE y los individuos con inflamación tratados con el mismo aceite (LPS-CBD/AE) ( $P \leq 0.05$ ).

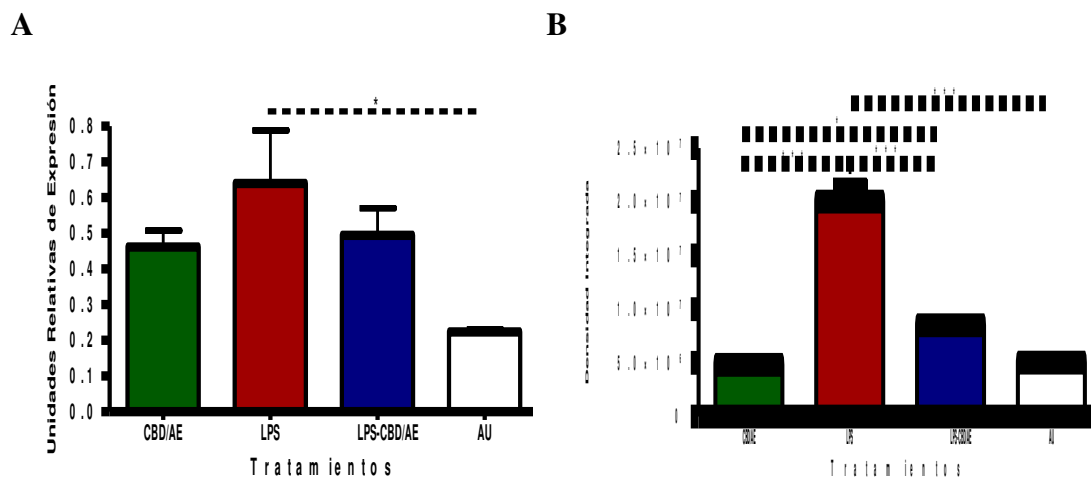


Figura 19: Expresión de ARNm y proteína PEPT1 en intestino grueso de ratones BALB/c. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

Finalmente, al compararse la expresión de PEPT1 entre intestino delgado y grueso en los principales grupos experimentales, solo se observó una mayor expresión significativa en intestino grueso ( $P \leq 0.05$ ) en el grupo LPS-CBD/AE (Figura 20A). Mientras que a nivel de marcaje de proteína PEPT1, éste fue mayor en intestino grueso que en delgado tanto en el grupo LPS ( $P \leq 0.05$ ) y LPS-CBD/AE ( $P \leq 0.001$ ) (Figura 20B)

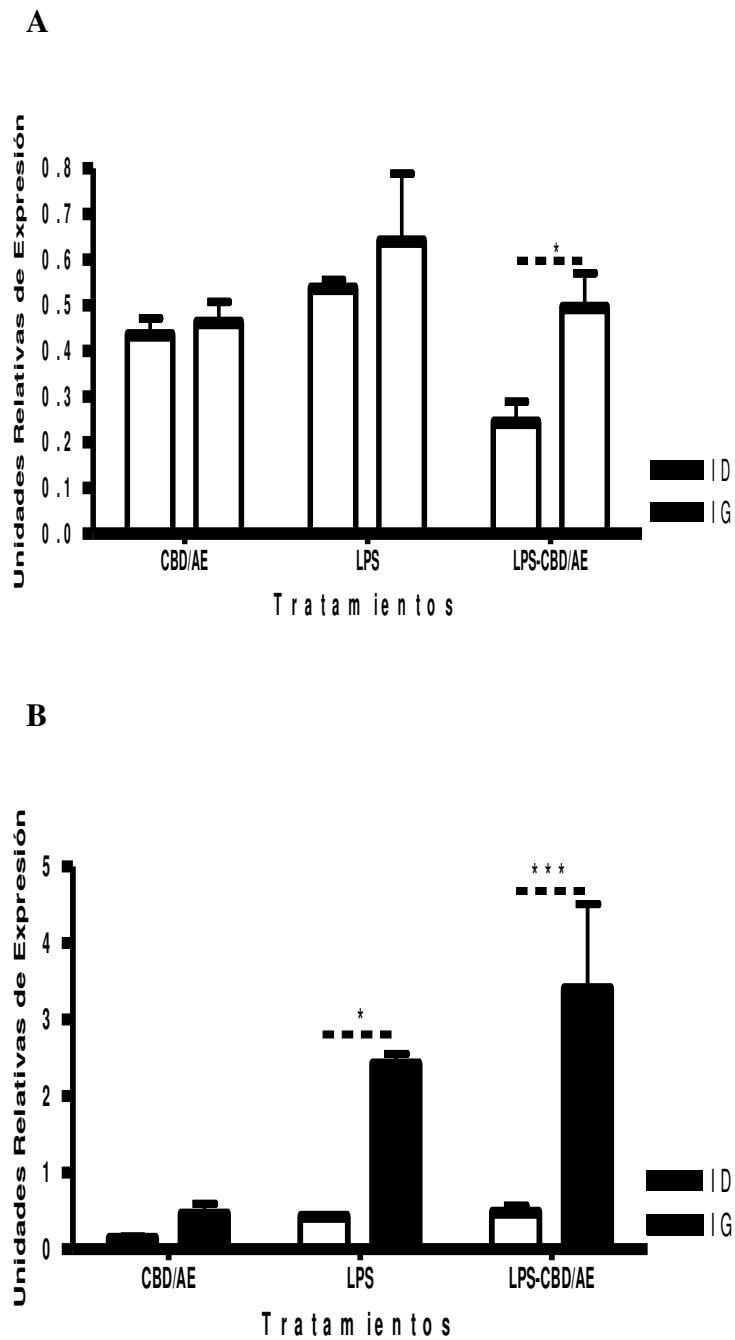


Figura 20: Expresión de ARNm y proteína PEPT1 en intestino de ratones BALB/c. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### **7.2.2. PPAR $\alpha$**

De igual manera que con PEPT1, se evaluó la expresión de PPAR $\alpha$  a nivel ARNm, localización de proteína y densidad integrada. Uno de los principales hallazgos en el presente estudio es la localización extranuclear de PPAR $\alpha$  en todos los grupos experimentales tanto en intestino delgado (Figuras 21 y 22) como en intestino grueso (Figuras 23 y 24), en donde se observó mayormente asociado al citoplasma de cuerpos celulares asociados a la lámina propia intestinal. En los individuos con inflamación intestinal inducida por LPS (Figura 22 y 24), el infiltrado celular en lámina propia fue mayor, así como la positividad de estos tejidos a la reacción de oxidación del DAB, evidenciando la presencia de PPAR $\alpha$ .



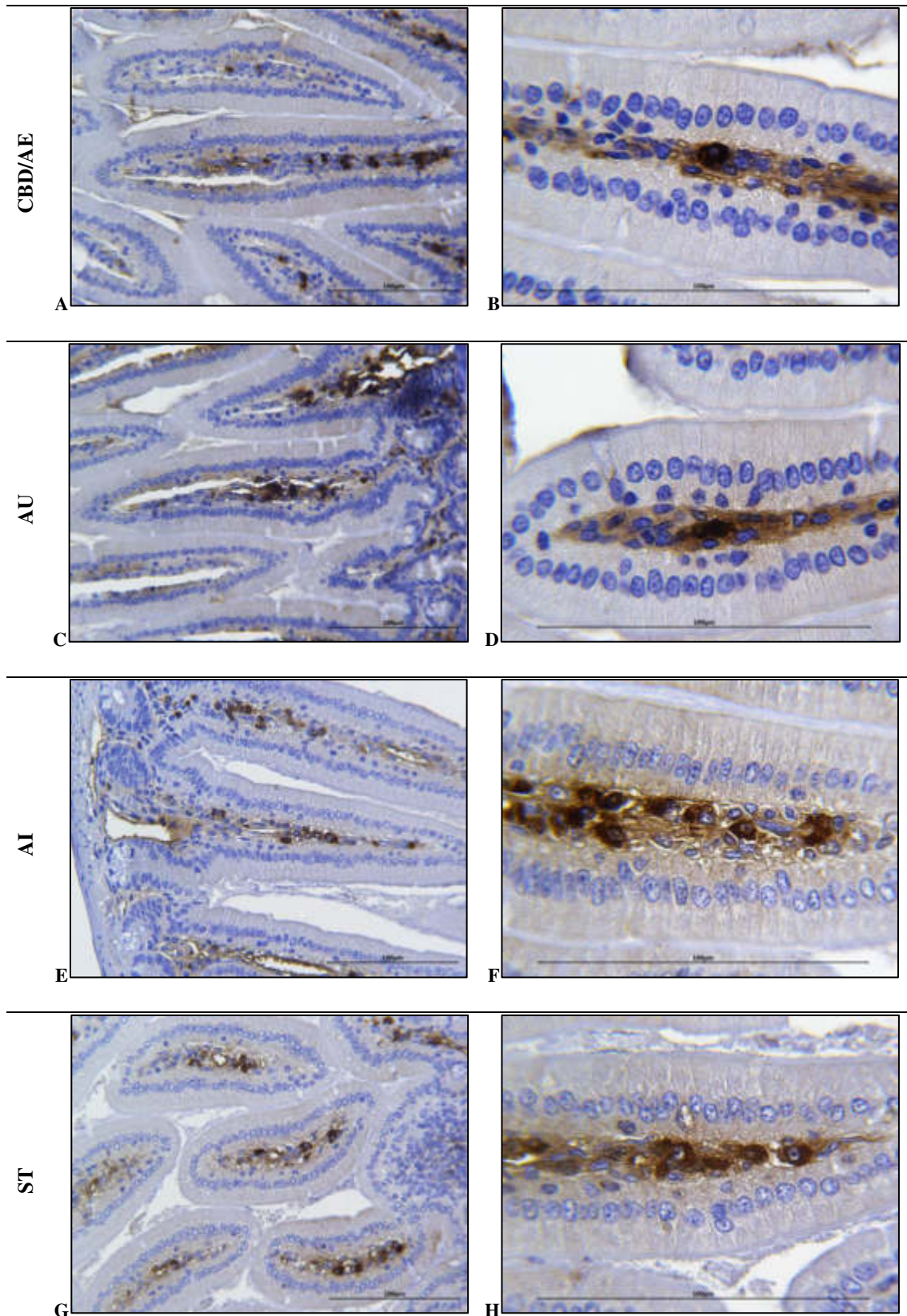


Figura 21: Inmunomarcaje anti-PPAR $\alpha$  en intestino delgado de ratones BALB/c, mediante la técnica de inmunohistoquímica. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. El marcaje anti-PPAR $\alpha$  se observó a nivel de lámina propia de manera extranuclear.

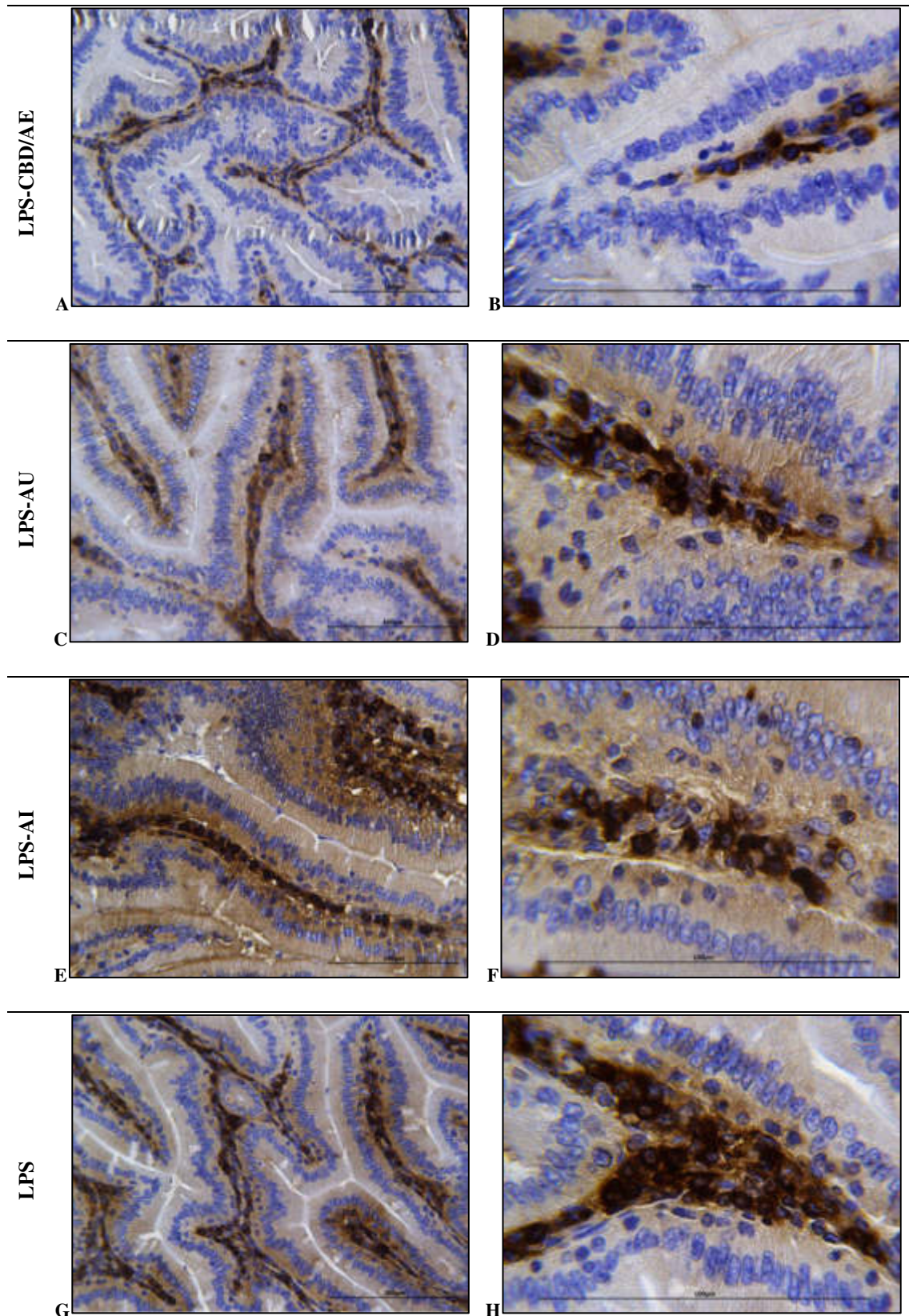


Figura 22: Inmunomarcaje anti-PPAR $\alpha$  en intestino delgado de ratones BALB/c como modelo de inflamaci3n, mediante la t3cnica de inmunohistoqu3mica. Las im3genes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las im3genes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajust3 a 100  $\mu$ m. El marcaje anti-PPAR $\alpha$  se observ3 en mayor grado en los grupos LPS.

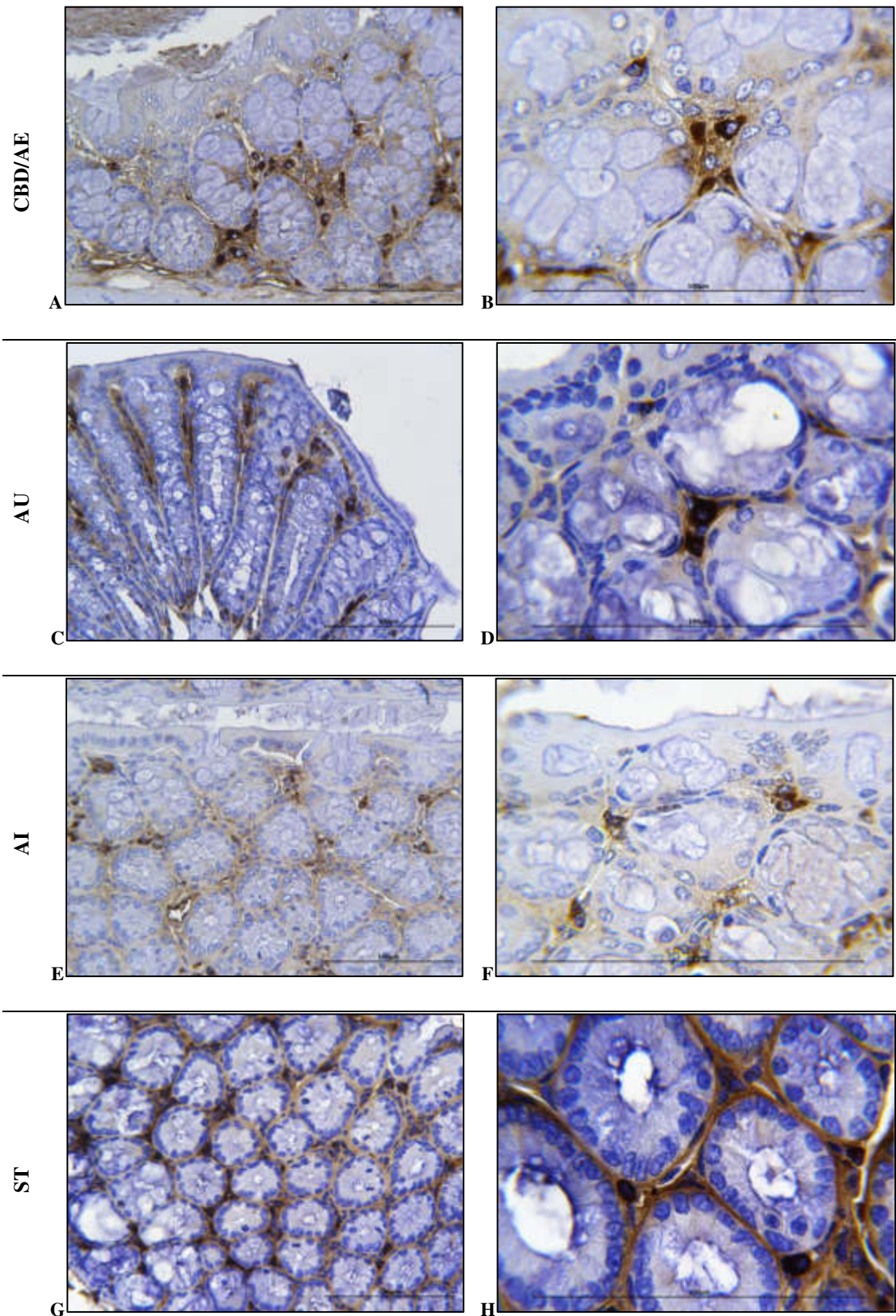


Figura 23: Inmunomarcaje anti-PPAR $\alpha$  en intestino grueso de ratones BALB/c, mediante la técnica de inmunohistoquímica. Las imágenes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las imágenes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajustó a 100  $\mu$ m. El marcaje anti-PPAR $\alpha$  se observó a nivel de lámina propia de manera extranuclear.

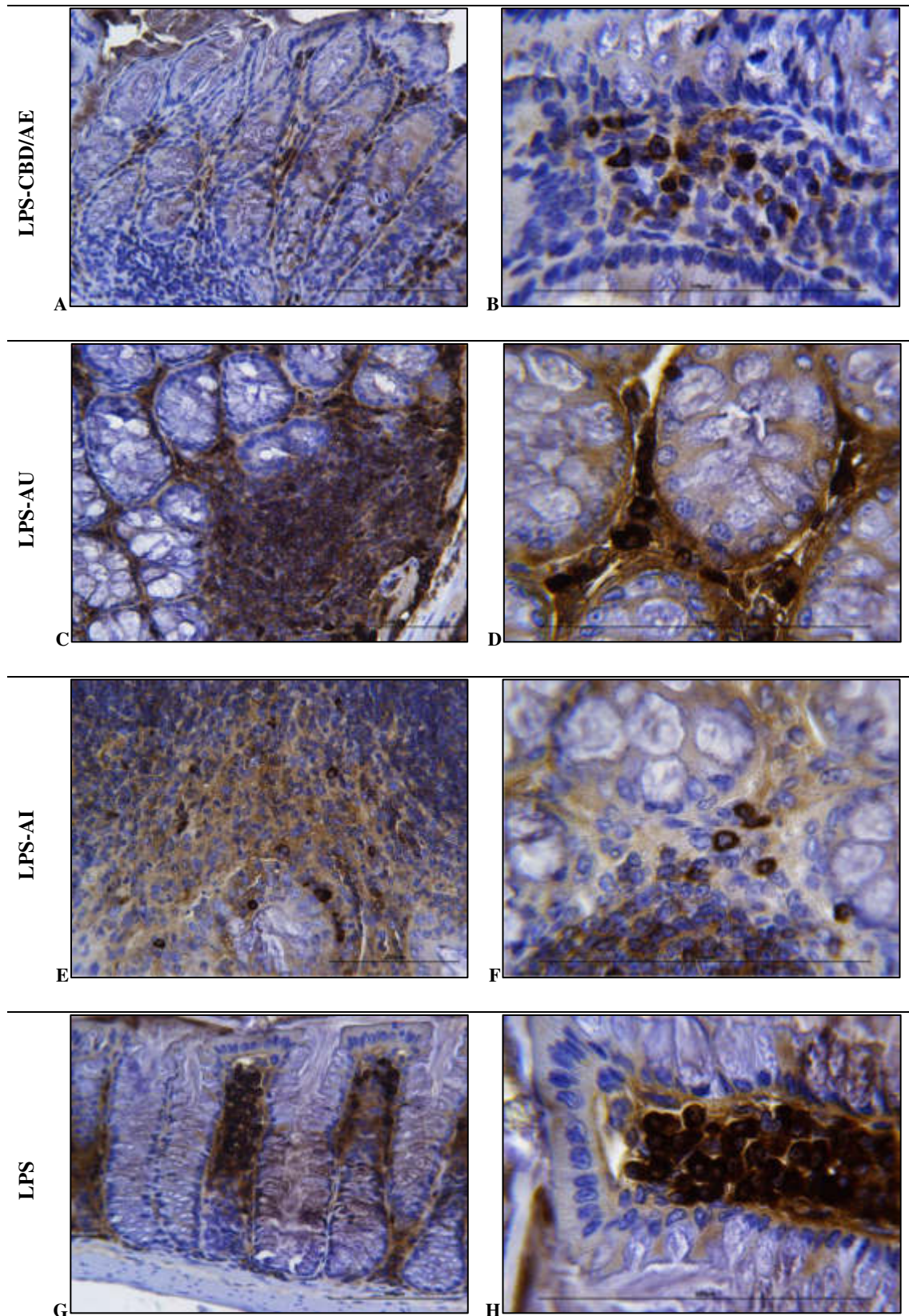


Figura 24: Inmunomarcaje anti-PPAR $\alpha$  en intestino grueso de ratones BALB/c como modelo de inflamaci3n, mediante la t3cnica de inmunohistoqu3mica. Las im3genes A,C, E y G fueron tomadas con un aumento de 40X. Las im3genes B, D, F y H fueron tomadas con un aumento de 100X. La barra de escala se ajust3 a 100  $\mu$ m. El marcaje anti-PPAR $\alpha$  se observ3 en mayor grado en los grupos LPS.

La expresión de ARNm y densidad integrada de proteína PPAR $\alpha$  en intestino delgado se muestran en la Figura 25. Los individuos tratados con CBD/AE y AU mostraron los menores niveles de expresión de ARNm de PPAR $\alpha$  (Figura 25A) a comparación del grupo control vehículo AU y el grupo sano tratado con CBD/AE, con diferentes niveles de significancia estadística, siendo éstos iguales entre sí ( $P>0.05$ ). Interesantemente, esta relación no se mantuvo a nivel de expresión de proteína (Figura 25B), en donde la cuantificación reveló que solo el grupo LPS tuvo mayores niveles que los individuos tratados con CBD/AE ( $P\leq 0.01$ ) y vehículo AU ( $P\leq 0.05$ ) y con el grupo LPS tratado con CBD/AE ( $P\leq 0.05$ ), siendo estos tres iguales entre sí ( $P\geq 0.05$ ).

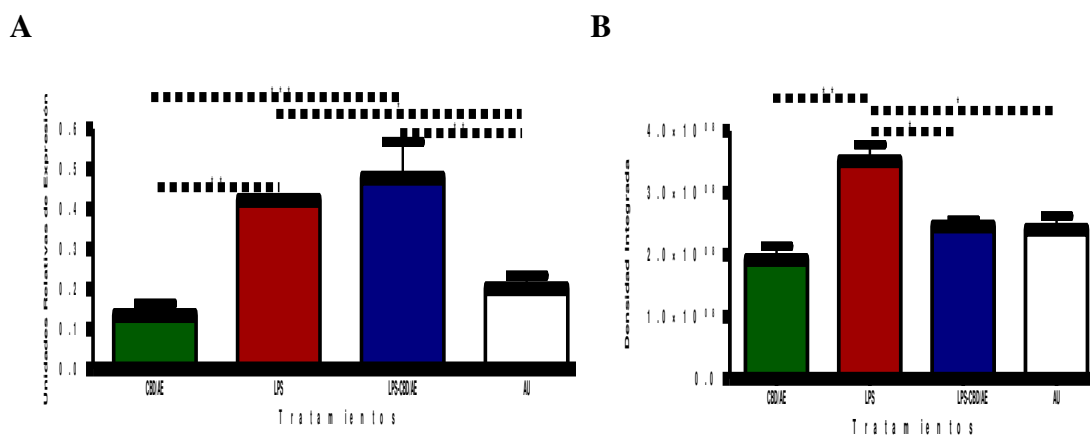


Figura 25: Expresión de ARNm y proteína PPAR $\alpha$  en intestino delgado de ratones BALB/c. \*  $p\leq 0.05$ , \*\*  $p\leq 0.01$ , \*\*\*  $p\leq 0.001$ .

De forma similar a su expresión en intestino delgado, en intestino grueso la expresión de PPAR $\alpha$  a nivel de ARNm (Figura 26A) fue mayor en los grupos tratados con LPS (LPS y LPS-CBD/AE), con diferencias estadísticas solo entre el grupo LPS-CBD/AE y los grupos control AU ( $P \leq 0.05$ ) y CBD/AE ( $P \leq 0.01$ ). Igualmente, a nivel de proteína (Figura 26B) se mantuvo elevado el marcaje para PPAR $\alpha$  en este tejido, con diferencias numéricas entre el grupo LPS y los demás grupos, y estadísticas entre éste y el grupo sano tratado con CBD/AE ( $P \leq 0.01$ ) y el grupo control AU ( $P \leq 0.05$ ).

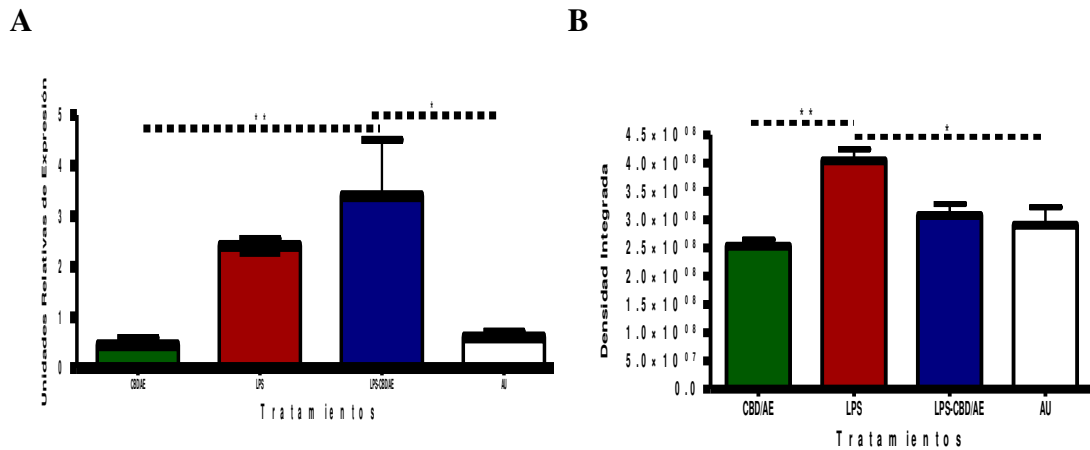
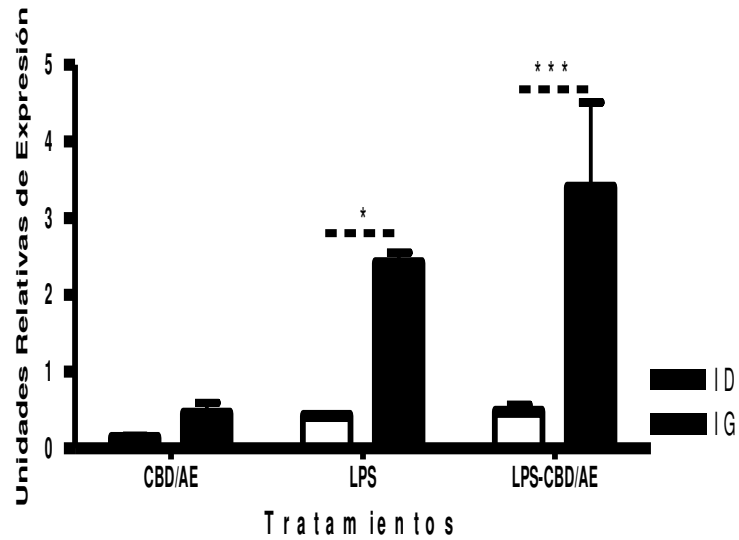


Figura 26: Expresión de ARNm y proteína PPAR $\alpha$  en intestino grueso de ratones BALB/c. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

Al compararse los niveles de expresión entre intestino delgado (Figura 27A) e intestino grueso, éstos fueron mayores en intestino grueso en los grupos LPS ( $P \leq 0.05$ ) y LPS-CBD/AE ( $P \leq 0.001$ ), e iguales en el grupo CBD/AE.

**A**



**B**

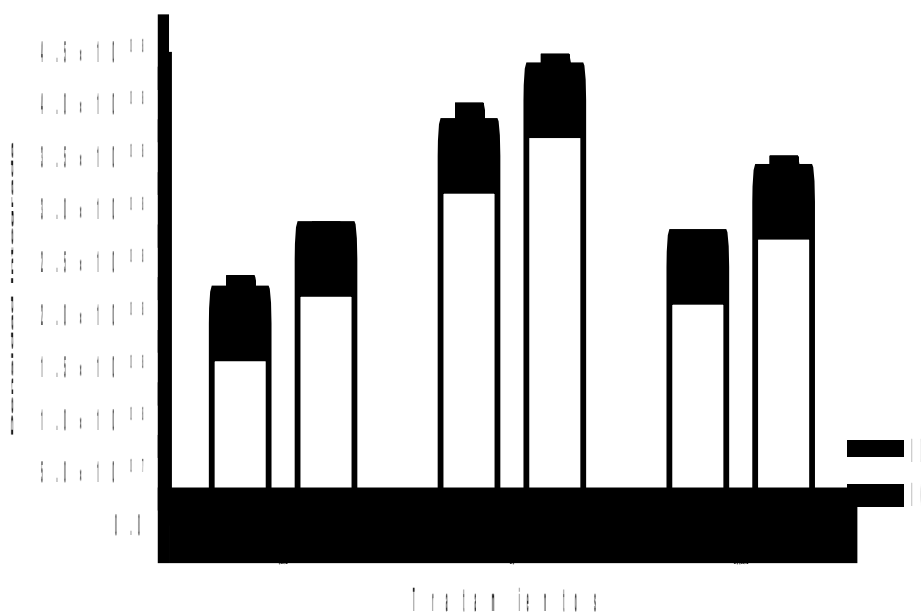


Figura 27: Expresión de ARNm y proteína PPAR $\alpha$  en intestino de ratones BALB/c. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### 7.2.3. Comparación de expresión de ARNm PEPT1 y ARNm PPAR $\alpha$ .

Al compararse los niveles de expresión de ARNm PEPT1 y ARNm PPAR $\alpha$  en intestino delgado (Figura 28A), el grupo sano tratado con CBD/AE mostró significativamente mayores ( $P \leq 0.01$ ) niveles de expresión de ARNm PEPT1. Esta diferencia se pierde en el grupo sano tratado con LPS y la relación se invierte en el grupo tratado con LPS y CBD/AE, en donde los mayores niveles de expresión fueron de ARNm de PPAR $\alpha$  con el mismo nivel de significancia ( $P \leq 0.01$ ). Por otra parte, en intestino grueso (Figura 28B) el grupo CBD/AE mostró los mismos niveles de expresión de ARNm de PEPT1 y PPAR $\alpha$ , los cuales se vieron considerablemente aumentados en los grupos tratados con LPS (LPS ( $P \leq 0.05$ ) y LPS-CBD/AE ( $P \leq 0.01$ )).

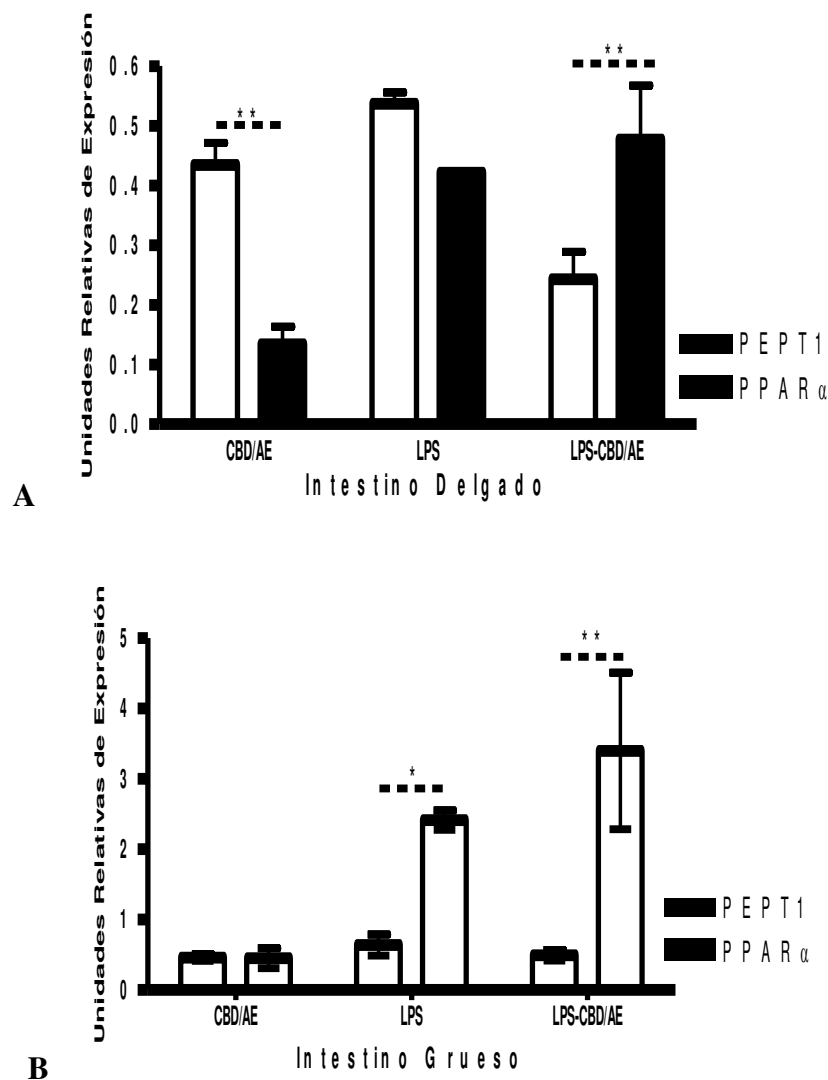


Figura 28: Expresión de ARNm de PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino de ratones BALB/c. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .



## 8. DISCUSIÓN.

En el presente estudio, se analizaron los efectos de un aceite de cannabis de amplio espectro rico en cannabidiol (CBD/AE) sobre la inflamación y en la expresión de ARNm y localización de las proteínas PEPT1, una proteína transportadora de péptidos intestinales y péptidos bacterianos; y PPAR $\alpha$ , factor de transcripción nuclear con afinidad a ligandos cannabinoides (Spanier & Rohm, 2018; D'Aniello et al., 2019) cuya actividad transcripcional se ha asociado a la expresión de PEPT1 (Okamura et al., 2014). A su vez, PEPT1 se ha asociado al estímulo inflamatorio intestinal, particularmente en enfermedades inflamatorias crónicas como la EII (Viennois et al., 2016). No obstante, resultados contradictorios han surgido sobre sus patrones de expresión, funcionalidad y papel en la salud y enfermedad en patologías intestinales y modelos animales diversos (Wuensch et al., 2014; Spanier & Rohm, 2018). Anteriormente se ha asociado la actividad transcripcional inducida por ligandos del receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa (PPAR $\alpha$ ) con la expresión intestinal de PEPT1 (Okamura et al., 2014). En este contexto, PPAR $\alpha$  actúa como un receptor nuclear que puede ser activado por ligandos de ácidos grasos que presenta afinidad por algunos cannabinoides fitogénicos, sintéticos y cannabinoides endógenos (Iannotti & Vitale, 2021). Se ha reportado que durante procesos inflamatorios ocurre un aumento en la expresión de receptores cannabinoides, así como PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , en la submucosa en células inmunes adyacentes (Couch et al., 2019). Diversos mecanismos directos e indirectos entre fitocannabinoides pueden inducir la actividad transcripcional de PPAR's (Morales et al., 2017), por lo que se propuso a este receptor y sus interacciones con cannabinoides como principales efectos el reducir procesos inflamatorios intestinales a través de la modulación en la expresión de PEPT1.

Algunos estudios reportan haber fallado en la expresión de ARNm de PEPT1 en muestras de colon sano o que la expresión de éste se encontraba en cantidades pequeñas (Vavricka et al., 2006; Dalmasso-Nguyen, et al., 2008; Viennois et al., 2016), contrastando con los hallazgos de Wuensch et al., en dónde localizaron ARNm y proteína PEPT1 en colon humano y de ratones sanos (2013). En el presente estudio demostramos la expresión de ARNm del gen de PEPT1 intestinal, el cual se encuentra expresado en todos los grupos experimentales, tanto en intestino delgado como en intestino grueso, lo que concuerda con los estudios de (Wuensch et al., 2013). En este estudio se realizó la cuantificación de ARNm por qPCR en tejido completo y no se

restringió meramente a enterocitos, por lo que bajo el presente protocolo no es posible discernir si los cambios de expresión de ARNm de PEPT1, así como el ARNm del gen de PPAR $\alpha$ , ocurrieron en algún tipo celular específico. A nivel de inmunohistoquímica y cuantificación de la densidad integrada que corresponde a zonas positivas a la presencia de las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$ , la reacción se concentró mayormente a nivel citoplasmático en células de la lámina propia intestinal, lo que contradice los hallazgos de algunos autores (Wuensch et al., 2014) quienes reportaron no haber encontrado la presencia de proteína PEPT1 en su caso por inmunofluorescencia en células de la lámina propia y que PEPT1 no está involucrado en los procesos inflamatorios en intestino. Por otra parte, otros autores han descrito la presencia de PEPT1 en células inflamatorias de lámina propia como macrófagos, y que esta localización y la función de PEPT1 está asociada al progreso de la inflamación, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación (Ayyadurai et al., 2013; Viennois et al., 2016).

Con respecto a la expresión de ARNm PEPT1 y PPAR $\alpha$ , estos niveles se encontraron elevados en intestino delgado y grueso de ratones BALB/c tratados con el LPS. Estos datos contrastan con los realizados por Shu et al. (2002) quienes realizaron un análisis de proteína y ARNm en intestino delgado reportando una disminución de la expresión de PEPT1 a nivel intestinal en ratas Wistar tratadas con LPS durante 3 días (Shu et al., 2002). Diversos modelos de inflamación intestinal han arrojados resultados contradictorios con respecto a la expresión de PEPT1 en intestino grueso con y sin inflamación. Diversos autores mencionan la ausencia de ARNm o proteína PEPT1 en colon sano, sin embargo dichos niveles de expresión se ven aumentados en cuadros inflamatorios como el síndrome de colon irritable (Merlin et al., 2001; Wojtal et al., 2009; Viennois et al., 2016) , validando parcialmente los hallazgos en nuestro estudio, en donde observamos un aumento en la expresión de ARNm PEPT1 en colon sin proceso inflamatorio, y bajo condiciones de inflamación dichos niveles de expresión mostraron un aumento.

Por otra parte, el aumento en la expresión de ARNm PPAR $\alpha$  en intestino delgado e intestino grueso inducido por la administración de LPS, concuerda con lo referido en la literatura bajo condiciones similares obteniendo hallazgos similares (Korbecki et al., 2019). Una cantidad creciente de evidencia señala que PPAR $\alpha$  también se localiza en la mucosa intestinal de intestino delgado y grueso y que su expresión en colon podría

estar asociada al control de la inflamación en EII. En el presente estudio se encontró localizada la proteína PPAR $\alpha$  únicamente a nivel extra-nuclear, mediante la técnica de inmunohistoquímica indirecta. Esta localización extra-nuclear fue similar a lo reportado por otros autores, quienes mencionan que los PPARs pueden alternar su localización del núcleo al citoplasma, similar a un efecto de translocación (Winczyk & Pawlikowski, 2005; Umemoto & Fujiki, 2012; Shao et al., 2020), y se ha sugerido que esta compartimentalización ocurre como un mecanismo para modular su actividad (Patel et al., 2005).

De acuerdo a la literatura, preparados de aceites ricos en cannabinoides, como el CBD, han mostrado efectos antiinflamatorios a nivel intestinal (Couch et al., 2018). Los mecanismos exactos bajo los cuales ciertos cannabinoides como el CBD y el CBG ejercen sus efectos antiinflamatorios aún no son claros. Éstos, y otros cannabinoides, pueden interactuar con receptores no CB1 o CB2, como receptores PPARs, TRPs, receptores de serotonina 5-HT1A, entre otros; y la inhibición de la actividad de enzimas degradadoras de cannabinoides endógenos. Estos cannabinoides se han utilizado en diversos modelos de inflamación y se ha reportado su capacidad para suprimir la liberación de citocinas proinflamatorias, entre otros mecanismos clave en la terapia de EII, sin embargo algunos autores también mencionan su capacidad para la producción de citocinas antiinflamatorias (Burstein, 2015; Martínez et al., 2020).

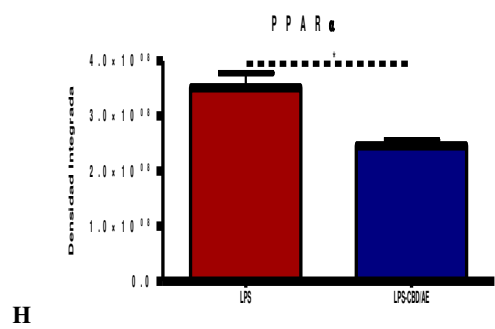
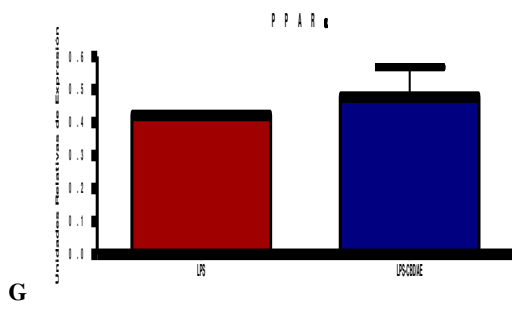
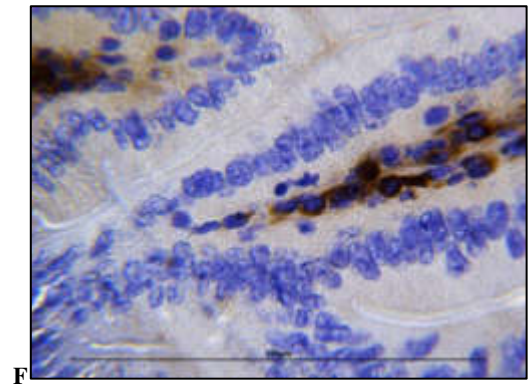
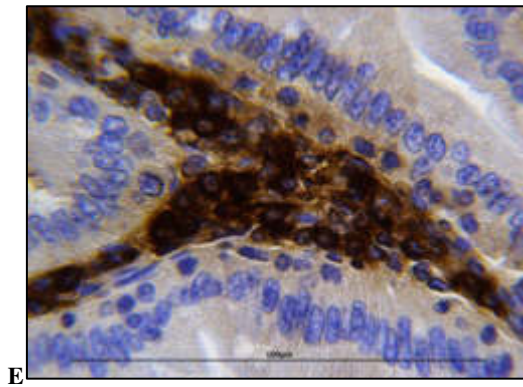
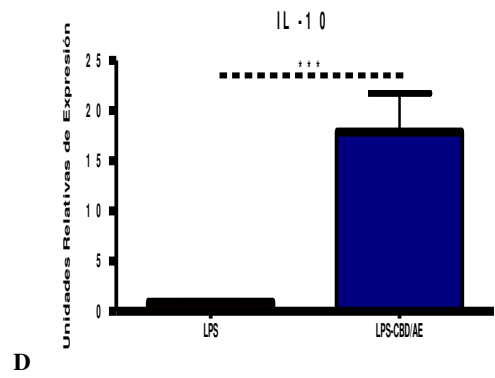
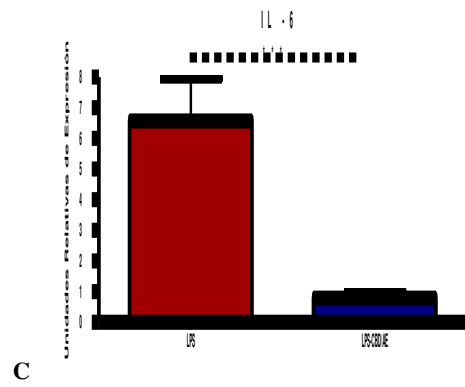
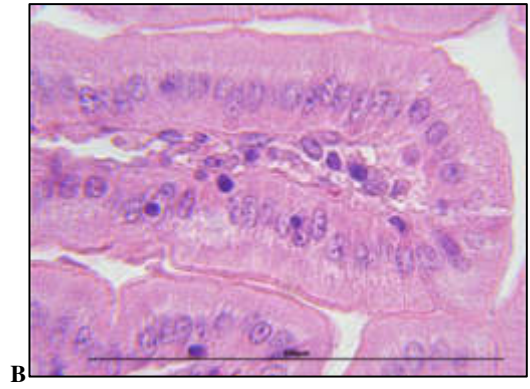
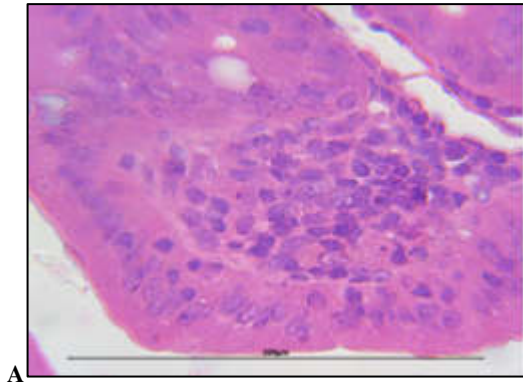
Una característica en común en algunos cuadros inflamatorios intestinales es el aumento en la permeabilidad del LPS de origen bacteriano y de otros antígenos, desde el lumen intestinal al plasma circulante y posteriormente su diseminación a otros tejidos (Guo et al., 2015). El uso de LPS en esta investigación se utilizó como un reflejo *in vitro* que simula una infección bacteriana principalmente, a través de la unión a receptores TLR4 y la consecuente liberación de citocinas proinflamatorias (Sylvia & Demas, 2018). En base a este antecedente se realizó un análisis de la expresión de las citocinas proinflamatorias como la IL-6, IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ ; y a su vez de citocinas antiinflamatorias en este caso IL-10 e IL-4. Los principales hallazgos fueron que el grupo LPS manifestó un aumento en los niveles de expresión de ARNm de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  tanto en intestino delgado como en intestino grueso. Inesperadamente, se observó un aumento a nivel de transcritos de IFN- $\gamma$  en el grupo tratado con LPS y CBD/AE en intestino delgado, siendo considerablemente menor la expresión en el grupo LPS tratado con CBD/AE en el intestino grueso. De acuerdo con la literatura, el

CBD generalmente ejerce efectos antiinflamatorios e inmunosupresores. Sin embargo, en algunos modelos *in vivo* e *in vitro* el CBD ha mostrado tener actividad inmunoestimulante, aumentando la respuesta mediada por anticuerpos, la degranulación neutrofílica, aumentos en la producción de citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ , en la quimiotaxis, activación celular de mastocitos y basófilos, así como aumento de fagocitosis, entre otros. Se ha reportado la supresión en la producción de IFN- $\gamma$  por el CBD. No obstante, bajo ciertas condiciones, este fitocannabinoide estimula su producción y la respuesta a genes inducidos por efecto del IFN- $\gamma$  que atenúan la proliferación de linfocitos T. Esto podría ser consecuencia de un estadio de inmunosupresión (Nichols & Kaplan, 2020).

En individuos sanos, la administración de CBD/AE a dosis de 100 mg/kg durante dos días, demostró aumentar la expresión de ARNm de PEPT1 en intestino delgado e intestino grueso. Sin embargo, estos resultados no se reflejaron a nivel de proteína PEPT1 en la inmunohistoquímica, lo cual podría indicar modificaciones postraduccionales de la proteína PEPT1 o fallas a nivel de conformación proteica o en el plegamiento de la misma, lo que dificultó la detección por parte de los anticuerpos utilizados. Los mecanismos bajo los cuales el CBD/AE logró aumentar los niveles de expresión relativa de ARNm de PEPT1 son diversos y podrían asociarse a interacciones directas o indirectas con PPAR $\alpha$ , u otros mecanismos aún no reportados en la literatura.

Los cambios en la expresión de ARNm, en conjunto con la localización de PPAR $\alpha$  y PEPT1 a nivel de proteína, en los grupos tratados con LPS, se pueden asociar a la inflamación intestinal, siendo corroborado por las funciones descritas en la literatura de ambas proteínas en este sitio de expresión y bajo el contexto inflamatorio, en donde PPAR $\alpha$  podría contribuir al control del proceso inflamatorio (Azuma et al., 2010), y en contraste, PEPT1 podría estar involucrado en el aumento de los estímulos del proceso inflamatorio (Ayyadurai et al., 2013). No obstante, no se puede descartar el potencial terapéutico de PEPT1 a nivel intestinal al poseer una actividad como co-transportador de fármacos péptido-miméticos, aminoácidos de la dieta en forma de péptidos (Wang et al., 2017), de péptidos con potencial antiinflamatorio (Dalmaso, Charrier-Hisamuddin, et al., 2008) y por último en la expresión de microARNs involucrados en la homeostasis intestinal (Zhang et al., 2016).

Al observar los patrones de expresión de PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino inflamado a consecuencia de la administración de LPS y tratado con CBD/AE (LPS y LPS-CBD/AE) (Figuras 29 y 30) se observaron patrones asociables a los procesos inflamatorios. En intestino delgado, este proceso inflamatorio se observó principalmente caracterizado por incrementos en el infiltrado celular de células mononucleares en lámina propia (Figura 29A), los cuales se observaron disminuidos al tratar con CBD/AE (Figura 29B); y el aumento en la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias como IL-6 (Figura 29C), disminuyendo al estar presente el CBD/AE (Figura 29D). Este infiltrado también se observó con la técnica de inmunohistoquímica para la proteína PPAR $\alpha$  en un mayor marcaje de células relacionadas a la lámina propia (Figura 29E) y menor marcaje de estas células al administrarse el CBD/AE (Figura 29F). A pesar de que este patrón no fue apreciable a nivel de ARNm (Figura 29G), se reflejó en la cuantificación de la densidad integrada de la proteína en forma dicha disminución (Figura 29H). Por último, la expresión de PEPT1 también se encontró asociada a la presencia de este infiltrado celular, mayormente observado en el grupo LPS (Figura 29I) y moderadamente disminuido bajo el tratamiento con CBD/AE (Figura 29J). Esto también se observó a nivel de ARNm (Figura 29K) y de marcaje de proteína (Figura 29L). Al observar la expresión de ARNm de PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino delgado (Figura 21M), se observa un recambio interesante. Al compararlos con un grupo control AU, en donde ambas proteínas se expresaron de manera similar, en el grupo LPS se observan ambas aumentadas con una leve diferencia numérica. Pero al añadir el CBD/AE, hay un recambio en la expresión. Se observa mayormente aumentado PPAR $\alpha$  que PEPT1, lo que podría indicar una relación entre los mecanismos de represión de la inflamación descritos en la literatura para PPAR $\alpha$  (Azuma et al., 2010), además del papel de PEPT1 estimulando el proceso inflamatorio (Ayyadurai et al., 2013).



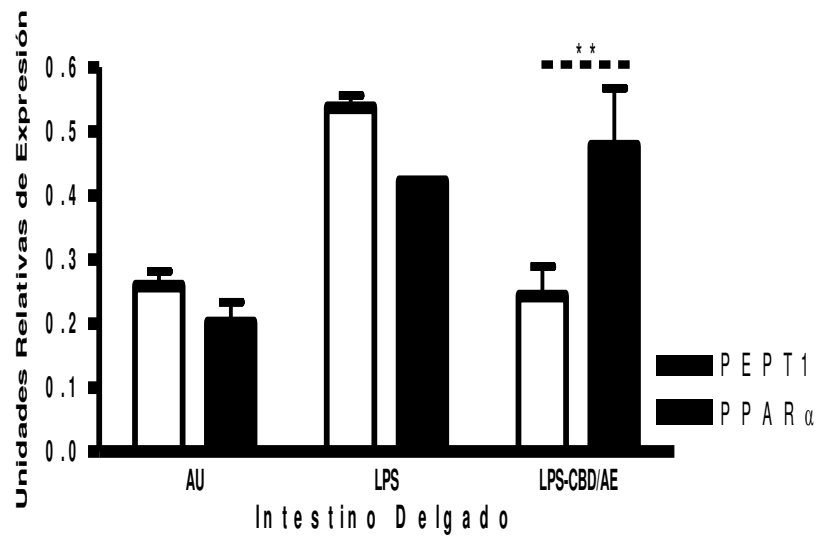
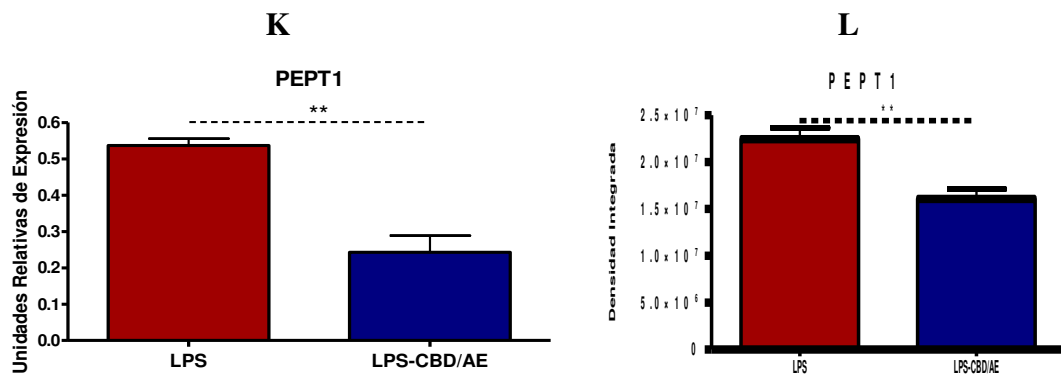
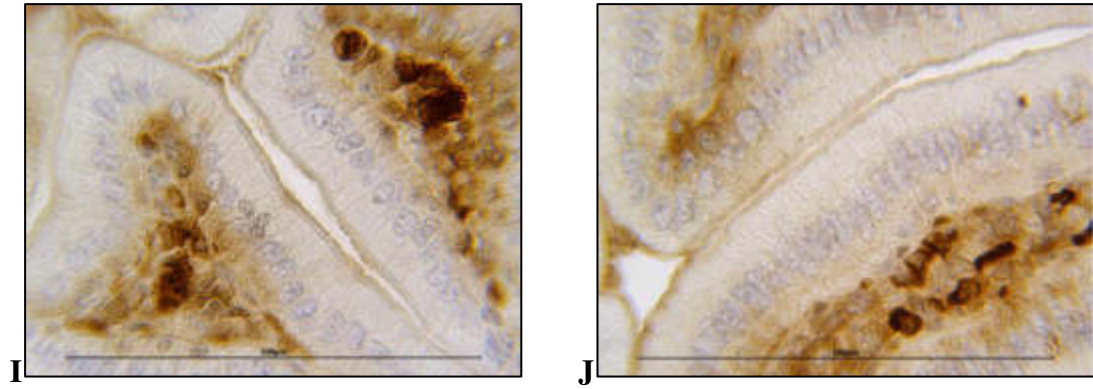
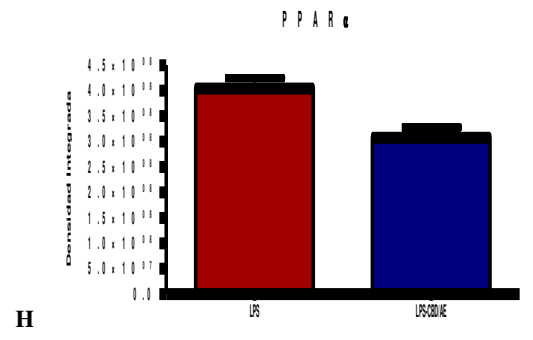
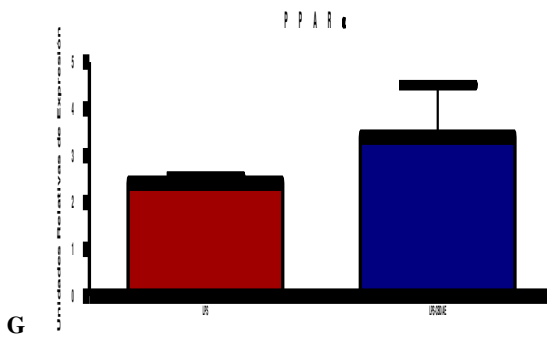
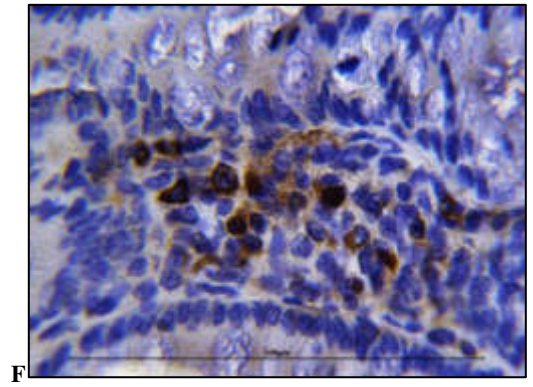
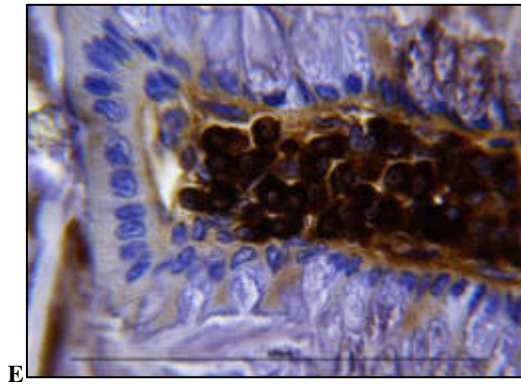
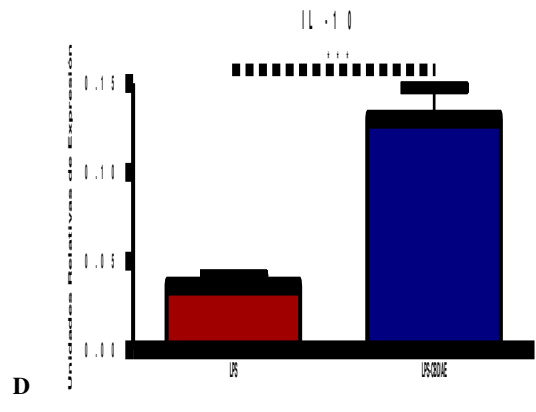
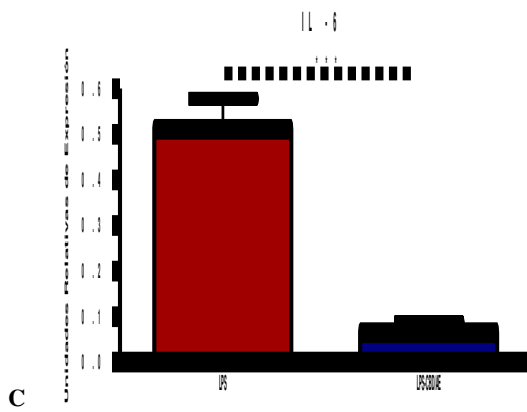
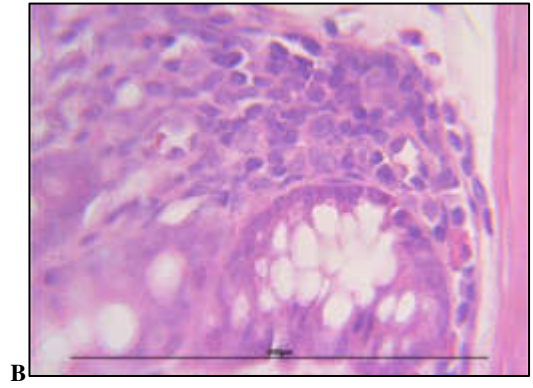
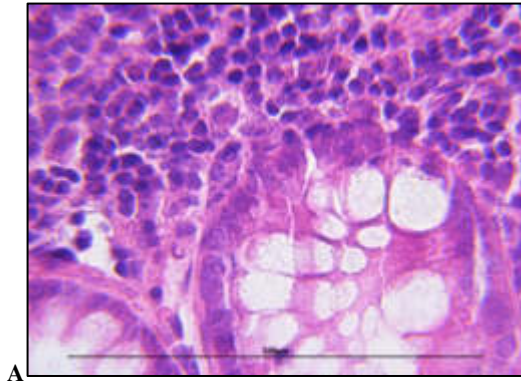


Figura 29: Análisis de expresión de las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino delgado de los grupos tratados con LPS: LPS y LPS-CBD/AE.

Estos patrones de expresión de ambas proteínas se ven parcialmente repetidos en intestino grueso (Figura 30), pero mayormente con diferencias numéricas. Un mayor grado de infiltrado de células mononucleares en lámina propia del grupo LPS (Figura 30A) que se ve disminuido al administrar el CBD/AE (Figura 30B). De igual manera esto se ve reflejado en un recambio de la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias como IL-6 (Figura 30C) a citocinas proinflamatorias como IL-10 (Figura 30D) en estos mismos grupos. El marcaje de PPAR $\alpha$  en este tejido de forma similar, asociado a la presencia de células inflamatorias en lámina propia (Figura 30A), que muestran disminuir al administrar el CBD/AE (Figura 30B). Esto no es apreciable a nivel de ARNm (Figura 30G), en donde ambos grupos mostraron estar en niveles similares de expresión. No obstante, si se aprecia de forma numérica a nivel del marcaje en la densidad integrada (Figura 30H). Nuevamente, esto se aprecia de forma similar en la expresión de PEPT1, en donde el marcaje se observó en células asociadas a la lámina propia, principalmente (Figura 30I); y disminuidas bajo el tratamiento con CBD/AE (Figura 30J). Esto no se observa en cambios entre estos dos grupos a nivel de expresión de ARNm de PEPT1 (Figura 30K) pero si en el marcaje a la proteína (Figura 30L). Por último, a diferencia de los patrones de recambio en la expresión de ARNm de PEPT1 y PPAR $\alpha$  descritos anteriormente, en intestino grueso no ocurre este recambio (Figura 30M) por lo que en este tejido podría no ocurrir el mismo mecanismo descrito para intestino grueso. Sin embargo, de acuerdo con la literatura, alteraciones en la expresión de ARNm de PEPT1 no reflejan del todo aumentos o disminuciones en su localización celular o funcionalidad (Spanier & Rohm, 2018)





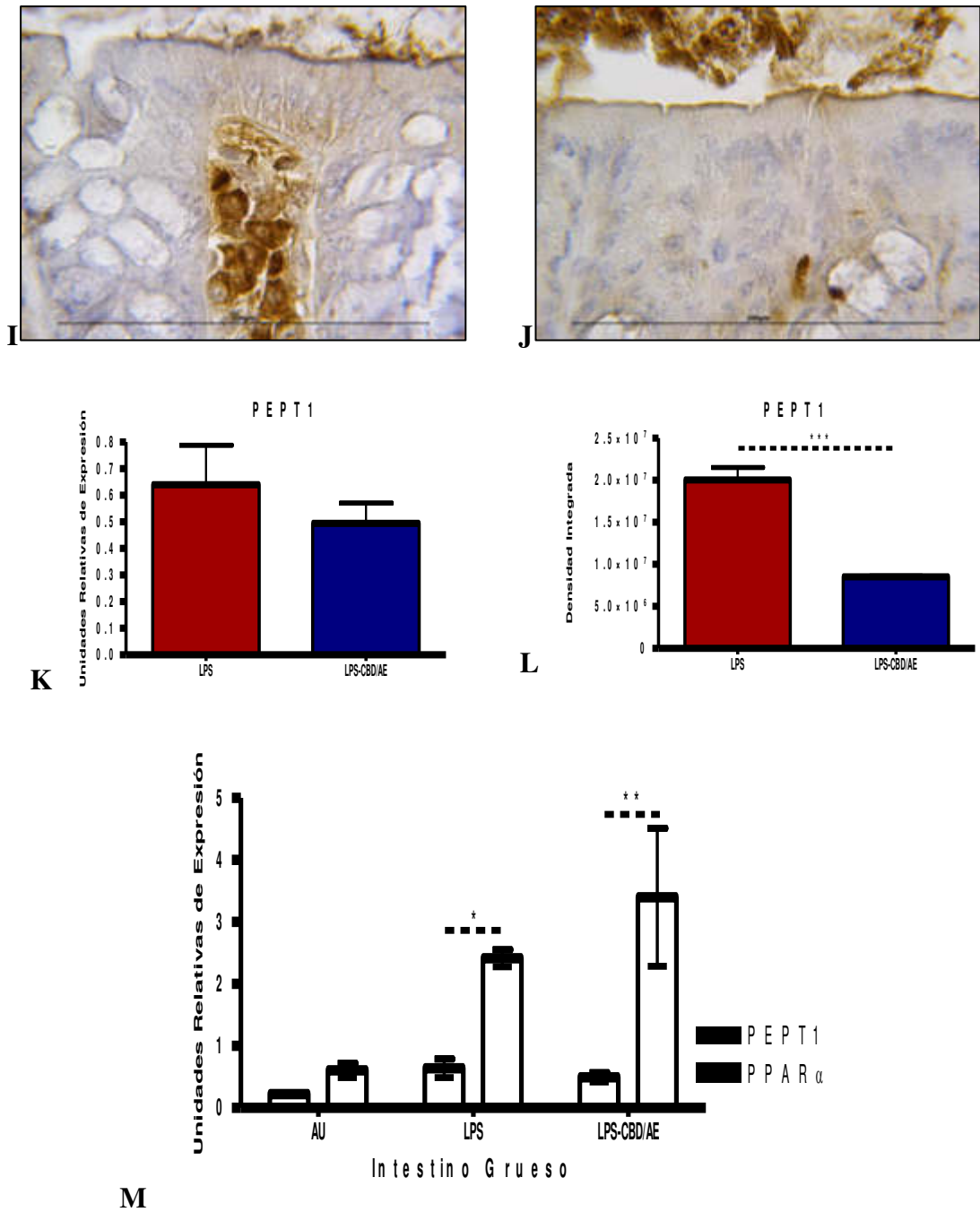


Figura 30: Análisis de expresión de las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino delgado de los grupos tratados con LPS: LPS y LPS-CBD/AE.

Finalmente, en base a estos resultados son necesarios más estudios a futuro en donde se evalúe una relación causal entre la función transcripcional de PPAR $\alpha$  inducida por ligandos cannabinoides y la expresión de PEPT1, y/o descartar si la asociación reportada en el presente estudio no es casual. Además, son necesarios estudios que evalúen la presencia de proteína PEPT1 funcional o inactiva y su papel en el desarrollo del cuadro inflamatorio y su posible papel terapéutico, lo cual podría ser dependiente del sitio de expresión.

## **9. CONCLUSIONES.**

1. PEPT1 se encuentra expresado en porciones mediales y distales de intestino grueso de ratones BALB/c y se encuentra en células asociadas a la lámina propia intestinal.

2. La expresión de PEPT1 a nivel de ARNm incrementa en presencia de un aceite de cannabis de amplio espectro rico en cannabidiol (CBD/AE).

3. PEPT1 podría estar asociado a estímulos proinflamatorios, así como PPAR $\alpha$  a la disminución de éste.

4. La expresión de PEPT1 y PPAR $\alpha$  se encuentra altamente asociada al proceso inflamatorio experimental inducido por LPS en ratones BALB/c, y su expresión asociada a células de la lámina propia intestinal disminuye a consecuencia de la administración de CBD/AE en intestino ratones BALB/c.

## 10. PERSPECTIVAS

La presente investigación provee los primeros indicios de una posible asociación o papel de las proteínas PEPT1 y PPAR $\alpha$  en intestino de un modelo de inflamación inducido por LPS bajo el estímulo de un aceite de cannabis (*Cannabis sativa* L.) de amplio espectro cuyo principal fitocannabinoide es el cannabidiol (CBD) con una menor cantidad del fitocannabinoide no psicotrópico, cannabigerol (CBG). Esta investigación representa el inicio de futuras investigaciones en donde se busque evaluar por medio de otras técnicas más rigurosas las cantidades de proteína en tejido intestinal, así como técnicas que permitan elucidar las vías por medio de las cuales los cannabinoides podrían modificar la expresión y/o funcionalidad de ambas proteínas, así como su papel en el proceso inflamatorio en diversos modelos animales de inflamación intestinal.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Adibi, S. A. (2003). Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285(5 48-5).  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00056.2003>
- Ain, Q. ul, Batool, M., & Choi, S. (2020). TLR4-Targeting Therapeutics: Structural Basis and Computer-Aided Drug Discovery Approaches. *Molecules*, 25(3), 627.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25030627>
- Arturo, I. F., & Fabiana, P. (2018). Endocannabinoidome. In *eLS* (Issue November 2018, pp. 1–10). John Wiley & Sons, Ltd.  
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0028301>
- Ayyadurai, S., Charania, M. A., Xiao, B., Viennois, E., & Merlin, D. (2013). PepT1 expressed in immune cells has an important role in promoting the immune response during experimentally induced colitis. *Laboratory Investigation*, 93(8), 888–899. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.77>
- Azuma, Y. T., Nishiyama, K., Matsuo, Y., Kuwamura, M., Morioka, A., Nakajima, H., & Takeuchi, T. (2010). PPAR $\alpha$  contributes to colonic protection in mice with DSS-induced colitis. *International Immunopharmacology*, 10(10), 1261–1267. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.07.007>
- Bein, A., Zilbershtein, A., Golosovsky, M., Davidov, D., & Schwartz, B. (2017). LPS Induces Hyper-Permeability of Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 232(2), 381–390. <https://doi.org/10.1002/jcp.25435>
- Bitencourt, R. M., & Takahashi, R. N. (2018). Cannabidiol as a Therapeutic Alternative for Post-traumatic Stress Disorder: From Bench Research to Confirmation in Human Trials. *Frontiers in Neuroscience*, 12(JUL), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00502>
- Brierley, D. I., Samuels, J., Duncan, M., Whalley, B. J., & Williams, C. M. (2016). Cannabigerol is a novel, well-tolerated appetite stimulant in pre-satiated rats. *Psychopharmacology*, 233(19–20), 3603–3613. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4397-4>

- Bukiya, A. N. (2019). Physiology of the Endocannabinoid System During Development. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1162, pp. 13–37). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_2)
- Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: A review of their effects on inflammation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(7), 1377–1385. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.059>
- Carvalho, A. C. A. de, Souza, G. A. de, Marqui, S. V. de, Guiguer, É. L., Araújo, A. C., Rubira, C. J., Goulart, R. de A., Flato, U. A. P., Bueno, P. C. D. S., Buchaim, R. L., & Barbalho, S. M. (2020). Cannabis and Canabidinoids on the Inflammatory Bowel Diseases: Going Beyond Misuse. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2940. <https://doi.org/10.3390/ijms21082940>
- Cather, J. C., & Cather, J. C. (2020). Cannabidiol primer for healthcare professionals. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 33(3), 376–379. <https://doi.org/10.1080/08998280.2020.1775437>
- Chen, H.-Q., Yang, J., Zhang, M., Zhou, Y.-K., Shen, T.-Y., Chu, Z.-X., Zhang, M., Hang, X.-M., Jiang, Y.-Q., & Qin, H.-L. (2010). Lactobacillus plantarum ameliorates colonic epithelial barrier dysfunction by modulating the apical junctional complex and PepT1 in IL-10 knockout mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(6), G1287–G1297. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00196.2010>
- Citti, C., Linciano, P., Russo, F., Luongo, L., Iannotta, M., Maione, S., Laganà, A., Capriotti, A. L., Forni, F., Vandelli, M. A., Gigli, G., & Cannazza, G. (2019). A novel phytocannabinoid isolated from Cannabis sativa L. with an in vivo cannabimimetic activity higher than  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol:  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabiphorol. *Scientific Reports*, 9(1), 20335. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56785-1>
- Clarke, R. C., & Watson, D. P. (2007). Cannabis and Natural Cannabis Medicines. In *Marijuana and the Cannabinoids* (pp. 1–15). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9_1)
- Couch, D. G., Cook, H., Ortori, C., Barrett, D., Lund, J. N., & O’Sullivan, S. E.

- (2019). Palmitoylethanolamide and Cannabidiol Prevent Inflammation-induced Hyperpermeability of the Human Gut In Vitro and In Vivo—A Randomized, Placebo-controlled, Double-blind Controlled Trial. *Inflammatory Bowel Diseases*, 25(6), 1006–1018. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz017>
- Couch, D. G., Maudslay, H., Doleman, B., Lund, J. N., & O’Sullivan, S. E. (2018). The Use of Cannabinoids in Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24(4), 680–697. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy014>
- D’Aniello, E., Fellous, T., Iannotti, F. A., Gentile, A., Allarà, M., Balestrieri, F., Gray, R., Amodeo, P., Vitale, R. M., & Di Marzo, V. (2019). Identification and characterization of phytocannabinoids as novel dual PPAR $\alpha$ / $\gamma$  agonists by a computational and in vitro experimental approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(3), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.01.002>
- Dalmaso, G., Charrier-Hisamuddin, L., Thu Nguyen, H. T., Yan, Y., Sitaraman, S., & Merlin, D. (2008). PepT1-Mediated Tripeptide KPV Uptake Reduces Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*, 134(1), 166–178. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.026>
- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Yan, Y., Charrier-Hisamuddin, L., Sitaraman, S. V., & Merlin, D. (2008). Butyrate transcriptionally enhances peptide transporter PepT1 expression and activity. *PLoS ONE*, 3(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002476>
- Degenhardt, F., Stehle, F., & Kayser, O. (2017). The Biosynthesis of Cannabinoids. In *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (Academic P, pp. 13–23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00002-8>
- Deiana, S., Watanabe, A., Yamasaki, Y., Amada, N., Arthur, M., Fleming, S., Woodcock, H., Dorward, P., Pigliacampo, B., Close, S., Platt, B., & Riedel, G. (2012). Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV),  $\Delta$  9-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behavior.

*Psychopharmacology*, 219(3), 859–873. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2415-0>

Di Marzo, V., & Wang, J. W. (2015). The Endocannabinoidome: The World of Endocannabinoids and Related Mediators. In *The Endocannabinoidome: The World of Endocannabinoids and Related Mediators*. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13461-7>

ElSohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). Phytochemistry of Cannabis sativa L. In *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa* (Springer, Vol. 103, pp. 1–36). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1)

Ewing, L. E., Skinner, C. M., Quick, C. M., Kennon-McGill, S., McGill, M. R., Walker, L. A., ElSohly, M. A., Gurley, B. J., & Koturbash, I. (2019). Hepatotoxicity of a Cannabidiol-Rich Cannabis Extract in the Mouse Model. *Molecules*, 24(9), 1694. <https://doi.org/10.3390/molecules24091694>

Fakhoury, M., Al-Salami, H., Negrulj, R., & Mooranian, A. (2014). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Journal of Inflammation Research*, 7(1), 113. <https://doi.org/10.2147/JIR.S65979>

Farag, S., & Kayser, O. (2017). The Cannabis Plant: Botanical Aspects. In A. Press (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (Issue January, pp. 3–12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00001-6>

Fernández-Ruiz, J., Romero, J., & Ramos, J. A. (2015). Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson’s Disease, Huntington’s Chorea, Alzheimer’s Disease, and Others. In R. G. Pertwee (Ed.), *Endocannabinoids* (Vol. 231, pp. 233–259). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_8)

Ghosh, S. S., Wang, J., Yannie, P. J., & Ghosh, S. (2020). Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *Journal of the Endocrine Society*, 4(2), 1–15. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvz039>

Grotenhermen, F., Russo, E., & Zuardi, A. W. (2017). Even High Doses of Oral



- Cannabidiol Do Not Cause THC-Like Effects in Humans: Comment on Merrick et al. *Cannabis and Cannabinoid Research* 2016;1(1):102–112; DOI: 10.1089/can.2015.0004. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 1–4. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0036>
- Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science*, xx(xx), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>
- Guo, S., Nighot, M., Al-Sadi, R., Alhmoud, T., Nighot, P., & Ma, T. Y. (2015). Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. *The Journal of Immunology*, 195(10), 4999–5010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402598>
- Hartsel, J. A., Boyar, K., Pham, A., Silver, R. J., & Makriyannis, A. (2019). Cannabis in Veterinary Medicine: Cannabinoid Therapies for Animals. In *Nutraceuticals in Veterinary Medicine* (pp. 121–155). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8_10)
- Hillig, K. W. (2005). Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(2), 161–180. <https://doi.org/10.1007/s10722-003-4452-y>
- Hug, H., Mohajeri, M., & La Fata, G. (2018). Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut. *Nutrients*, 10(2), 203. <https://doi.org/10.3390/nu10020203>
- Iannotti, F. A., & Vitale, R. M. (2021). The Endocannabinoid System and PPARs: Focus on Their Signalling Crosstalk, Action and Transcriptional Regulation. *Cells*, 10(3), 586. <https://doi.org/10.3390/cells10030586>
- Iffland, K., & Grotenhermen, F. (2017). An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 139–154. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0034>
- Ingersoll, S. A., Ayyadurai, S., Charania, M. A., Laroui, H., Yan, Y., & Merlin, D.

- (2012). The role and pathophysiological relevance of membrane transporter PepT1 in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(5), G484–G492. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00477.2011>
- Jamontt, J., Molleman, A., Pertwee, R., & Parsons, M. (2010). The effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol alone and in combination on damage, inflammation and in vitro motility disturbances in rat colitis. *British Journal of Pharmacology*, 160(3), 712–723. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00791.x>
- Jergens, A. E., & Simpson, K. W. (2012). Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Frontiers in Bioscience - Elite*, 4 E(4), 1404–1419. <https://doi.org/10.2741/e470>
- Kicman, A., & Toczek, M. (2020). The Effects of Cannabidiol, a Non-Intoxicating Compound of Cannabis, on the Cardiovascular System in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6740. <https://doi.org/10.3390/ijms21186740>
- Korbecki, J., Bobiński, R., & Dutka, M. (2019). Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflammation Research*, 68(6), 443–458. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01231-1>
- Ladha, K. S., Ajrawat, P., Yang, Y., & Clarke, H. (2020). Understanding the Medical Chemistry of the Cannabis Plant is Critical to Guiding Real World Clinical Evidence. *Molecules*, 25(18), 4042. <https://doi.org/10.3390/molecules25184042>
- Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Slavik, D., & Raskin, I. (2015). The composition of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil and its potential as an important source of nutrition for man. *International Journal of Chemical and Biochemical Research*, 3(Juli), 16. <https://doi.org/10.1300/J133v02n04>
- Martínez, V., Iriando De-Hond, A., Borrelli, F., Capasso, R., del Castillo, M. D., & Abalo, R. (2020). Cannabidiol and Other Non-Psychoactive Cannabinoids for Prevention and Treatment of Gastrointestinal Disorders: Useful Nutraceuticals? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3067.

<https://doi.org/10.3390/ijms21093067>

- Mazgaen, L., & Gurung, P. (2020). Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2), 379. <https://doi.org/10.3390/ijms21020379>
- McPartland, J. M. (2018). Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *3*(1), 203–212. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0039>
- Meletis, C. (2019). The Important Role of the Endocannabinoid System and the Endocannabinoidome in Gut Health. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, *25*(S2), 24–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31202201>
- Merlin, D., Si-Tahar, M., Sitaraman, S. V., Eastburn, K., Williams, I., Liu, X., Hediger, M. A., & Madara, J. L. (2001). Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: Transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. *Gastroenterology*, *120*(7), 1666–1679. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.24845>
- Merrick, J., Lane, B., Sebree, T., Yaksh, T., O’Neill, C., & Banks, S. L. (2016). Identification of Psychoactive Degradants of Cannabidiol in Simulated Gastric and Physiological Fluid. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *1*(1), 102–112. <https://doi.org/10.1089/can.2015.0004>
- Monthony, A. S., Page, S. R., Hesami, M., & Jones, A. M. P. (2021). The Past, Present and Future of Cannabis sativa Tissue Culture. *Plants*, *10*(1), 185. <https://doi.org/10.3390/plants10010185>
- Mooij, M. G., De Koning, B. E. A., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Simons-Oosterhuis, Y., Van Groen, B. D., Tibboel, D., Samsom, J. N., & De Wildt, S. N. (2016). Human intestinal PEPT1 transporter expression and localization in preterm and term infants. *Drug Metabolism and Disposition*, *44*(7), 1014–1019. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.068809>
- Morales, P., Hurst, D. P., & Reggio, P. H. (2017). Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. In *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistri and Pharmacology of Cannabis sativa* (Springer N, pp.

103–131). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_4)

Okamura, A., Koyanagi, S., Dilxiat, A., Kusunose, N., Chen, J. J., Matsunaga, N., Shibata, S., & Ohdo, S. (2014). Bile acid-regulated peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) activity underlies circadian expression of intestinal peptide absorption transporter PepT1/Slc15a1. *Journal of Biological Chemistry*, 289(36), 25296–25305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577023>

Patel, H., Truant, R., Rachubinski, R. A., & Capone, J. P. (2005). Activity and subcellular compartmentalization of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  are altered by the centrosome-associated protein CAP350. *Journal of Cell Science*, 118(1), 175–186. <https://doi.org/10.1242/jcs.01600>

Pesce, M., D'Alessandro, A., Borrelli, O., Gigli, S., Seguella, L., Cuomo, R., Esposito, G., & Sarnelli, G. (2017). Endocannabinoid-related compounds in gastrointestinal diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(2), 706–715. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13359>

Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>

Russo, E. B. (2007). History of Cannabis and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1614–1648. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790144>

Schoultz, I., & Keita, Å. V. (2020). The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*, 9(8), 1909. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>

Shao, W., Kuhn, C., Mayr, D., Ditsch, N., Kailuwait, M., Wolf, V., Harbeck, N., Mahner, S., Jeschke, U., Cavaillès, V., & Sixou, S. (2020). Cytoplasmic PPAR $\gamma$  is a marker of poor prognosis in patients with Cox-1 negative primary breast cancers. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02271-6>

- Shu, H. J., Takeda, H., Shinzawa, H., Takahashi, T., & Kawata, S. (2002). Effect of lipopolysaccharide on peptide transporter 1 expression in rat small intestine and its attenuation by dexamethasone. *Digestion*, *65*(1), 21–29.  
<https://doi.org/10.1159/000051927>
- Silver, R. J. (2019). The Endocannabinoid System of Animals. *Animals*, *9*(9), 686.  
<https://doi.org/10.3390/ani9090686>
- Spanier, B., & Rohm, F. (2018). Proton coupled oligopeptide transporter 1 (PepT1) function, regulation, and influence on the intestinal homeostasis. *Comprehensive Physiology*, *8*(2), 843–869.  
<https://doi.org/10.1002/cphy.c170038>
- Splichal, I., Rychlik, I., Splichalova, I., Karasova, D., & Splichalova, A. (2020). Toll-Like Receptor 4 Signaling in the Ileum and Colon of Gnotobiotic Piglets Infected with Salmonella Typhimurium or Its Isogenic  $\Delta$ rfa Mutants. *Toxins*, *12*(9), 545. <https://doi.org/10.3390/toxins12090545>
- Stephens, M., & von der Weid, P.-Y. (2020). Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner. *Gut Microbes*, *11*(3), 421–432. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1629235>
- Sylvia, K. E., & Demas, G. E. (2018). Acute intraperitoneal lipopolysaccharide influences the immune system in the absence of gut dysbiosis. *Physiological Reports*, *6*(5), e13639. <https://doi.org/10.14814/phy2.13639>
- Toczek, M., & Malinowska, B. (2018). Enhanced endocannabinoid tone as a potential target of pharmacotherapy. *Life Sciences*, *204*(1), 20–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.054>
- Turner, S. E., Williams, C. M., Iversen, L., & Whalley, B. J. (2017). Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. In *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa* (Spanier, Vol. 103, pp. 61–101). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_3)
- Umemoto, T., & Fujiki, Y. (2012). Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . *Genes to*

*Cells*, 17(7), 576–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01607.x>

Vavricka, S. R., Musch, M. W., Fujiya, M., Kles, K., Chang, L., Eloranta, J. J., Kullak-Ublick, G. A., Drabik, K., Merlin, D., & Chang, E. B. (2006). Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  increase PepT1 expression and activity in the human colon carcinoma cell line Caco-2/bbe and in mouse intestine. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 452(1), 71–80.

<https://doi.org/10.1007/s00424-005-0007-8>

Viennois, E., Ingersoll, S. A., Ayyadurai, S., Zhao, Y., Wang, L., Zhang, M., Han, M. K., Garg, P., Xiao, B., & Merlin, D. (2016). Critical Role of PepT1 in Promoting Colitis-Associated Cancer and Therapeutic Benefits of the Anti-inflammatory PepT1-Mediated Tripeptide KPV in a Murine Model. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(3), 340–357.

<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.01.006>

Wang, C.-Y., Liu, S., Xie, X.-N., & Tan, Z.-R. (2017). Regulation profile of the intestinal peptide transporter 1 (PepT1). *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 11, 3511–3517. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S151725>

Winczyk, K., & Pawlikowski, M. (2005). Immunohistochemical detection of PPAR $\gamma$  receptors in the human pituitary adenomas: Correlation with PCNA. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 43(3), 137–141. <https://doi.org/10.5603/4610>

Wojtal, K. A., Eloranta, J. J., Hruz, P., Gutmann, H., Drewe, J., Staumann, A., Beglinger, C., Fried, M., Kullak-Ublick, G. A., & Vavricka, S. R. (2009). Changes in mRNA Expression Levels of Solute Carrier Transporters in Inflammatory Bowel Disease Patients. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(9), 1871–1877. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.027367>

Wuensch, T., Schulz, S., Ullrich, S., Lill, N., Stelzl, T., Rubio-Aliaga, I., Loh, G., Chamailard, M., Haller, D., & Daniel, H. (2013). The peptide transporter PEPT1 is expressed in distal colon in rodents and humans and contributes to water absorption. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(1), 66–73. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00491.2012>

Wuensch, T., Ullrich, S., Schulz, S., Chamailard, M., Schaltenberg, N., Rath, E.,

Goebel, U., Sartor, R. B., Prager, M., Büning, C., Bugert, P., Witt, H., Haller, D., & Daniel, H. (2014). Colonic expression of the peptide transporter PEPT1 is downregulated during intestinal inflammation and is not required for NOD2-dependent immune activation. In *Inflammatory Bowel Diseases* (Vol. 20, Issue 4, pp. 671–684). <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000443336.71488.08>

Yang, R. B., Mark, M. R., Gurney, A. L., & Godowski, P. J. (1999). Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *163*(2), 639–643. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395652>

Zhang, Y., Viennois, E., Zhang, M., Xiao, B., Han, M. K., Walter, L., Garg, P., & Merlin, D. (2016). PepT1 Expression Helps Maintain Intestinal Homeostasis by Mediating the Differential Expression of miRNAs along the Crypt-Villus Axis. *Scientific Reports*, *6*(27119), 1–21. <https://doi.org/10.1038/srep27119>

Żuk-Gołaszewska, K., Żuk-Gołaszewska, K., & Gołaszewski, J. (2018). Cannabis sativa L. – cultivation and quality of raw material. *Journal of Elementology*, *23*(3/2018), 971–984. <https://doi.org/10.5601/jelem.2017.22.3.1500>

## 12. ANEXOS

### 12.1. Técnica histológica: procesamiento de muestras.

Una vez extraídos los tejidos, fueron lavados con PBS 1X y colocados en PFA 4% durante 48 horas. Una vez fijados los tejidos, éstos fueron encapsulados en cassettes de inclusión y etiquetados. Éstos se lavaron en durante 10 minutos en agua corriente y enjuagados en agua destilada. Las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación (Tabla 8) para posteriormente ser incluidos en bloques de parafina para su posterior corte en microtomo y finalmente ser rehidratados (Tabla 9) previo al proceso de tinción.

Tabla 8: Procedimiento de deshidratación.

<b>Solución</b>	<b>Tiempo de inmersión:</b>
1. Alcohol etílico 60%	1 h
2. Alcohol etílico 70%	1 h
3. Alcohol etílico 80%	1 h
4. Alcohol etílico 96%	1 h
5. Alcohol etílico 96%	1 h
6. Alcohol etílico absoluto	1 h
7. Alcohol etílico absoluto	1 h
8. Etanol absoluto y Xilol (1:1)	1 h
9. Xilol	1 h
10. Xilol	1 h
11. Parafina líquida	1 h
12. Parafina líquida	1 h

Tabla 9: Desparafinación e Hidratación

<b>Solución:</b>	<b>Tiempo de inmersión:</b>
1. Xilol	5 min
2. Etanol absoluto y Xilol (1:1)	5 min
3. Etanol absoluto	2 min
4. Alcohol etílico al 96%	2 min
5. Agua destilada	Enjuague lento



## 12.2. Tinción de Hematoxilina & Eosina

Es una tinción de contraste que se puede emplear para detectar alteraciones morfológicas. Se utilizan dos colorantes: hematoxilina, que se utiliza como un colorante básico y tiñe de azul/púrpura el núcleo celular; y eosina, un colorante ácido que tiñe de rosa/rojo el citoplasma, tejidos fibrosos o el fondo de los componentes tisulares (Tabla x).

Tabla 10: Pasos para la tinción de H&E.

<b>Solución</b>	<b>Tiempo de inmersión:</b>
1. Hematoxilina	2 min
2. Agua corriente (2 lavados)	Enjuague
3. Alcohol ácido	1 inmersión rápida
4. Agua corriente (2 lavados)	Enjuague lento
5. Agua amoniacal	2 inmersiones rápidas
6. Agua corriente (2 lavados)	Enjuague lento
7. Agua destilada	Enjuague lento
8. Eosina	6 inmersiones rápidas
9. Alcohol al 96%	Enjuague breve
10. Alcohol al 96%	1 min
11. Etanol absoluto	2 min
12. Etanol absoluto	2 min
13. Etanol absoluto y Xilol (1:1)	3 min
14. Xilol	2 min
15. Xilol	3 min

### 12.2.1. Reactivos utilizados en la tinción H&E.

#### a) Hematoxilina de Gill:

Los reactivos son homogeneizados en el orden enlistado a continuación (Tabla 11) con un agitador magnético a temperatura ambiente. Finalmente, la solución se filtra previo a su uso.

Tabla 11: Reactivos para la preparación de Hematoxilina de Gill.

<b>Reactivo:</b>	<b>Cantidad:</b>
H <sub>2</sub> O	730 ml
Etilenglicol	250 ml
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 g
Yodato de sodio	0.2 g
Sulfato de aluminio	17.6 g
Ácido acético glacial	2 ml

#### b) Eosina:

Se prepara a partir de una solución en stock (Tabla 12). La solución final se utiliza en una relación 1:3 de solución stock-alcohol al 80%, añadiendo 0.5 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de colorante preparado (Tabla 13).

Tabla 12: preparación de solución de stock de Eosina.

<b>Reactivo:</b>	<b>Cantidad:</b>
Eosina amarillenta	1 g
Agua destilada	20 ml
Alcohol absoluto	80 ml

Tabla 13: preparación de la tinción de Eosina.

<b>Reactivo:</b>	<b>Cantidad:</b>
Stock de Eosina	25 ml
Alcohol al 80%	75 ml
Ácido acético glacial	0.5 ml

c) Solución de alcohol-ácido:

Tabla 14: Preparación de la solución de alcohol-ácido.

<b>Reactivo:</b>	<b>Cantidad:</b>
Alcohol al 70%	99 ml
Ácido clorhídrico concentrado	1 ml

d) Solución de Agua Amoniaca

Tabla 15: Preparación de la solución de agua amoniacal.

<b>Reactivo:</b>	<b>Cantidad:</b>
Agua destilada	99 ml
Hidróxido de Amonio	1 ml

### 12.3. Tinción de Ácido Peryódico de Schiff

La técnica histoquímica de PAS (Ácido Peryódico de Schiff) se utiliza para identificar componentes celulares ricos en hidratos de carbono, los cuales se observarán de color rosa o violeta-púrpura (Tabla 16).

Tabla 16: Pasos para la tinción de PAS.

<b>Solución</b>	<b>Tiempo de inmersión:</b>
1. Ácido periódico al 0.5%	7 min
2. Agua destilada	Enjuague lento
3. Reactivo de Schiff	20 min
4. Solución enjuagadora sulfurosa	2 min
5. Solución enjuagadora sulfurosa	2 min
6. Agua corriente (2 lavados)	Enjuague lento
7. Agua destilada	Enjuague lento
8. Hematoxilina de Gill	2 min
9. Agua corriente	Enjuague lento
10. Alcohol ácido	Enjuague breve
11. Agua amoniacal	Enjuague breve
12. Agua corriente	Enjuague lento
13. Agua destilada	Enjuague lento
14. Alcohol al 96%	Enjuague breve
15. Alcohol al 96%	1 min
16. Etanol absoluto	2 min
17. Etanol absoluto	2 min
18. Etanol absoluto y Xilol (1:1)	3 min
19. Xilol	2 min
20. Xilol	3 min

### 12.3.1. Reactivos utilizados en la tinción de PAS.

Solución acuosa de ácido periódico 0.5%:

Tabla 17: Preparación de la solución acuosa de ácido periódico al 0.5%.

<b>Reactivo:</b>	<b>Cantidad:</b>
Ácido Peryódico (cristales)	0.5 g
Agua destilada	100 ml

Solución enjuagadora sulfurosa:

Tabla 18: Preparación de la solución enjuagadora sulfurosa.

<b>Reactivo:</b>	<b>Cantidad:</b>
Agua destilada	300 ml
Ácido clorhídrico 1N	15 ml
Metabisulfito de Sodio 10%	18 ml

Solución de metabisulfito de sodio 10%:

Tabla 19: Preparación de la solución de metabisulfito de sodio.

<b>Reactivo:</b>	<b>Cantidad:</b>
Metabisulfito de sodio	10 g
Agua destilada	100 ml

Solución de ácido clorhídrico al 1N:

Tabla 20: Preparación de la solución de ácido clorhídrico al 1N.

<b>Reactivo:</b>	<b>Cantidad:</b>
Ácido clorhídrico	8.35 ml
Agua destilada	91.65 ml

12.4. Análisis de fitocannabinoides contenidos en el extracto CBD/AE.



Rapid Analytics  
1680 Pearl st.  
(541) 654-8129  
December 13, 2019

This is for informational purposes only and cannot be used for compliance or labeling.

**Business:** Octave Labs  
**Contact:** Austyn Jiminez

**Phone No.:** (541) 373-0358

**Email:** [Austyn@Octave-Labs](mailto:Austyn@Octave-Labs)

**Sample Name:** 104.2 After Roto

**Sample Type:** Distillate

**Lab ID:** 1911132

**Date Received:** December 12, 2019

**Date Analyzed:** December 13, 2019

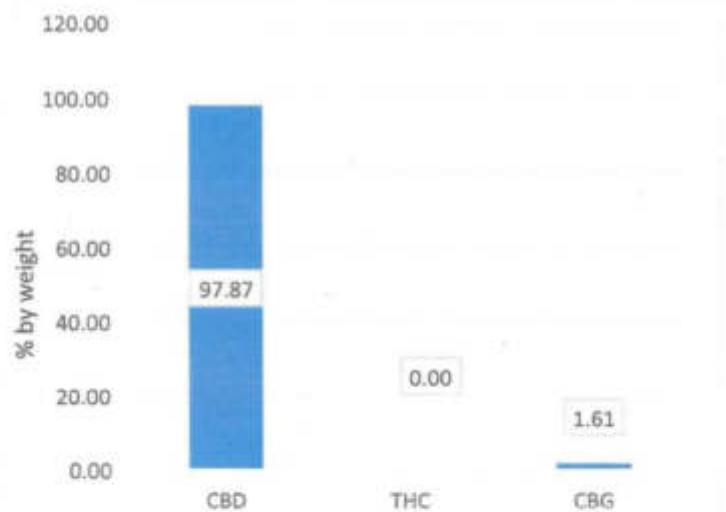


**Total % THC LOQ**

**Total % CBD 97.87**

**Total % CBG 1.61**

Cannabinoid	% by dry weight	mg/g
CBDA	LOQ	LOQ
CBD	97.87	978.7
CBDV	0.6	0.6
THCA	LOQ	LOQ
Δ9-THC	LOQ	LOQ
Δ8-THC	LOQ	LOQ
CBGA	LOQ	LOQ
CBG	1.61	16.1
CBN	LOQ	LOQ
CBC	LOQ	LOQ
Moisture %	0.00	
<b>Total</b>	<b>&gt;99.99</b>	<b>995.40</b>



LOQ is defined as below 0.2% by weight and 2.0 mg/g.

Total THC and Total CBD are calculated values using the Oregon reporting requirement (OAR 333-064-0100). In this calculation, the acid form of the cannabinoid is multiplied by 0.877 to account for decarboxylation. The decarboxylate acid is added to the cannabinoid value for the total cannabinoid. Total CBG is calculated using the same formula.

All values have been adjusted for moisture content of flower/bio-mass.

David Errington, Laboratory Director

December 13, 2019

Date