



**RIDAA**  
Repositorio Institucional  
Digital de Acceso Abierto de la  
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

Duhart, José Manuel

# Interacción entre el sistema inmune y el reloj biológico



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Duhart, J. M. (2019). *Interacción entre el sistema inmune y el reloj biológico. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/961>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## Interacción entre el sistema inmune y el reloj biológico

TESIS DOCTORAL

**José Manuel Duhart**

joseduhart@gmail.com

### Resumen

Los ritmos circadianos, presentes en la gran mayoría de los seres vivos, consisten en oscilaciones en diversas variables fisiológicas, que ocurren con un período cercano a 24 horas. Estos ritmos están sostenidos por un reloj circadiano endógeno que, en mamíferos, se localiza anatómicamente en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo. El reloj circadiano controla un gran número de procesos y funciones y, generalmente, existen mecanismos de retroalimentación que permiten que el oscilador sea ajustado por el estado de algunas de las variables que controla. Las funciones llevadas a cabo por el sistema inmunológico se encuentran bajo un estricto control del reloj circadiano, y, recientemente, se ha descrito que la activación del sistema inmune es capaz de alterar al oscilador circadiano. En el presente trabajo se estudiaron diferentes modelos de activación inmunológica y sus consecuencias sobre el reloj biológico, caracterizando los actores moleculares y celulares que participan en la misma.

En el Capítulo 1 se estudiaron los efectos de la activación inmune de los astrocitos de los NSQ, y sus consecuencias sobre el reloj circadiano. Encontramos que la citoquina proinflamatoria Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  es capaz de alterar el reloj molecular de los astrocitos de NSQ, y que el efecto que produce depende del estado, o fase, en la que se encuentra el oscilador. A su vez, mostramos que, en respuesta a TNF- $\alpha$ , los astrocitos son capaces de alterar la expresión de genes reloj, y el funcionamiento de los NSQ, tanto *ex vivo* como *in vivo*.

En el Capítulo 2, nos enfocamos en el estudio del rol de la quimioquina CCL2 en la comunicación entre el sistema inmune y el reloj. Valiéndonos de un modelo de activación inmune periférica, la administración de LPS intraperitoneal, encontramos que esta molécula se induce en los NSQ y que es necesaria para las alteraciones en el reloj producidas por el LPS periférico. A su vez, caracterizamos la expresión del receptor de esta quimioquina, CCR2, el cual presenta variaciones diarias en sus niveles que podrían determinar la ventana temporal en la cual el reloj circadiano es sensible a la estimulación inmune periférica.

Finalmente, en el Capítulo 3 estudiamos los efectos sobre el reloj circadiano de un modelo de alteración prolongada del entorno inmunológico, como son los gliomas hipotalámicos. Encontramos que el desarrollo de gliomas hipotalámicos, produce cambios en las características endógenas del reloj circadiano, y en su capacidad de sincronizarse a los ciclos de luz – oscuridad. A su vez, evaluamos la posibilidad de que el reloj circadiano module la fisiología de estas células tumorales, en particular de procesos importantes para la respuesta a quimioterapéuticos. Encontramos que la sensibilidad de las células de glioma al quimioterapéutico de mayor uso en este tipo de patologías (Temozolomida) presenta oscilaciones circadianas.

Los resultados presentados en esta tesis amplían entonces el conocimiento acerca de los mecanismos que permiten al sistema inmunológico modular al reloj circadiano. Estos resultados aportan a un entendimiento integral de las interacciones neuroinmunes, de importancia en un gran número de patologías. A su vez, destacan la importancia de los enfoques bidireccionales en este tipo de estudios ya que ambos sistemas (el circadiano y el inmunológico) son capaces de dialogar uno con el otro.



# **Interacción entre el sistema inmune y el reloj biológico**

**Autor: Lic. José Manuel Duhart**

**Director: Dr. Diego Andrés Golombek**

**Trabajo presentado para optar por el título de Doctor de la  
Universidad Nacional de Quilmes Mención Ciencias Básicas y  
Aplicadas**

**Laboratorio de Cronobiología. Departamento de Ciencia y Tecnología.  
Universidad Nacional de Quilmes.**

**2015**



## **Agradecimientos.**

A los miembros del Laboratorio de Cronobiología. A lo largo de los años en los que se desarrolló esta Tesis, el Laboratorio fue mucho más que un lugar donde realizar experimentos. El lector sabrá disculpar, entonces, la extensión de este párrafo. Infinitas gracias: A Diego por acompañarnos y guiarnos, no sólo en nuestros primeros pasos por la ciencia, sino en cada uno de nuestros pasos y tropiezos que damos en la vida. Porque siempre está, sea como sea, a la hora que sea y desde donde sea. Porque además de ser un gran director es, antes que nada, un gran tipo. A Juan, porque definitivamente es una de esas personas que no te dejan parado de la misma manera ante la vida una vez que te las cruzás. Porque, como dijo el Che: “No creo que seamos parientes muy cercanos, pero si usted es capaz de temblar de indignación cada vez que se comete una injusticia en el mundo, somos compañeros, que es más importante”. A Juli, por su inmensa paciencia, no sólo para enseñarme mis primeras armas en la investigación, sino para bancar mi personalidad cuando recién arrancaba. A Nati y Male, por su compañía y ayuda en los *overnights* (y en muchos, muchos experimentos), y por remarla conmigo en el bando crono-inmune. A Santi y Lea, por abrirme la cabeza con la música y el cine, y por acompañarme desde los primeros días en el labo. A Andrés e Ivi, por prestarme su oído y su optimismo cuando todo se me hacía negro. A Fer, porque su dosis de buen humor fueron combustible indispensable para arrancar todos los días (en especial los Lunes). Al Flaco, por compartir la locura por los astrocitos, por sus consejos y chistes cada vez que los necesité. A Carlos, porque algo había que revolucionar, y revolucionó al laboratorio, con análisis locos, programas, circuitos, humor y algún que otro trago. A Lau, por bancarse mis peores ataques de mal humor, sin tener arte ni parte, y en vez de mandarme al diablo preocuparse por ayudarme. A Pato, Euge, Sole, Agustín, Lucho, Jony y Fer2 por las charlas, los consejos, los mates, la música y las sonrisas. A Lu, por el aguante cuando los experimentos se nos ponían en contra y por regalarme su frescura y su hermosa compañía.

A toda la comunidad del Departamento de C y T de la UNQ, por crear un ámbito donde la ayuda mutua es lo que prima.

A todos los miembros del Laboratorio de Oncología Molecular. Porque sin ellos gran parte de mis experimentos hubiesen sido imposibles de realizar, y por sobre todo, por tener siempre una sonrisa, un mate y algo rico cada vez que los necesité. Muy especialmente gracias a Georgi por su constante ayuda y discusiones con el proyecto de glioma.

A la gente de Morehouse: Alec, Oscar, Jennifer, Gianluca, Ken y Susana, por hacer tan satisfactoria mi primera experiencia de trabajo fuera de la UNQ (y de Argentina), siempre dispuestos a ayudarme y aconsejarme.

A mis amigos de "Atlanta": Shiromi, Raquel, Christian, Paola, Patrick, Zoltan, Jansen y Cristóbal. Porque la ciencia nos cruzó fortuitamente, y nos regaló una amistad impensada entre 8 nacionalidades distintas, que construimos en pocos meses, y que continúa varios años después.

A los que aportaron una cena especial cada semana: Romi, Maca, Mati, Nati, Hec, Mir, Lu y Nuni (y Carlos y Fer). Porque fueron la válvula de escape en este último tiempo bancándome en todas, con las comidas más abundantes, y los abrazos más fuertes siempre que los necesité.

A Nacho (Cachito), Pablo, Silvio, Villa, Alan y Ale. Por estar antes, ahora y siempre. Con Tesis o sin Tesis. Viviendo a dos cuadras o a 8.000 kms.

A mis Padres. Por no entregarme otra cosa que amor y empuje. Por el apoyo incondicional y por su constante esfuerzo para que pueda seguir cada meta que me propuse.

## Abreviaturas utilizadas.

AVP: Péptido Arginina-Vasopresina.

BHE: Barrera hemato-encefálica.

CALB: Calbindina.

CCL2: Quimiocina (motivo C-C) ligando 2.

CCR2: Receptor de quimiocina (motivo C-C) 2.

CRF: Curva de respuesta de fase.

CT: *Circadian Time*.

GFAP: Proteína glial fibriliar acídica.

GRP: Péptido liberador de gastrina.

HPA: Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.

Icv: Intracerebroventricular.

IFN: Interferón.

IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 $\beta$ .

IL-1R: Receptor de interleuquina 1.

IL-1RA: Antagonista del receptor de interleuquina 1.

IL-6: Interleuquina 6.

IL-10: Interleuquina 10.

IL-12p70: Subunidad p70 de la interleuquina 12.

Ip: Intraperitoneal.

LPS: Lipopolisacárido.

L:O: Luz:Oscuridad.

MC-IL-1: Medios condicionados de astrocitos tratados con interleuquina 1 $\beta$ .

MC-LPS: Medios condicionados de astrocitos tratados con lipopolisacárido.

MC-TNF: Medios condicionados de astrocitos tratados con factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

MC-Veh: Medios condicionados de astrocitos tratados con vehículo.

MAPK: Quinasa de la proteína activada por mitógeno.

NF $\kappa$ B: Factor nuclear  $\kappa$ B.

NO: Óxido Nítrico.

NPV: Núcleos Paraventriculares.

NSQ: Núcleos Supraquiasmáticos.  
O:O: Oscuridad constante.  
OVLT: Organum vasculosum de la lamina terminalis.  
PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato.  
PBS: Buffer fosfato salino.  
PK-2: Proquinecitina-2  
RORE: Reve-erb $\alpha$  Responsive Element.  
SFB: Suero fetal bovino.  
SNC: Sistema Nervioso Central.  
TGF- $\alpha$ : Factor de crecimiento transformante- $\alpha$ .  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .  
TNFR1: Receptor tipo 1 del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .  
TNFsR: Receptor soluble del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .  
TRH: Tracto Retino-Hipotalámico.  
Veh: Vehículo.  
VIP: Péptido intestinal vasoactivo.  
Wt: Cepa salvaje.  
ZT: *Zeitgeber Time*.

## Índice.

### 1. Introducción General

#### 1.1 Los ritmos circadianos en mamíferos

1.1.1 Hay tiempo para el tiempo.....	1
1.1.2 Ciclos ambientales y ritmos biológicos .....	3
1.1.3 Breve historia de los ritmos biológicos .....	4
1.1.4 Variables oscilatorias .....	6
1.1.5 Mecanismos generales de los ritmos biológicos.....	8
1.1.6 Métodos de estudio de ritmos biológicos.....	11
1.1.7 El sistema circadiano en mamíferos: el reloj endógeno.....	14
1.1.7.1 Localización anatómica.....	14
1.1.7.2 Bases moleculares.....	18
1.1.8 El sistema circadiano de mamíferos: la sincronización.....	23
1.1.9 El sistema circadiano de mamíferos: las vías de salida.....	26

#### 1.2 La comunicación inmune-circadiana

1.2.1 Neuroinmunología.....	29
1.2.2 La respuesta inmune en el SNC.....	29
1.2.3 Las vías de señalización inmune desde la periferia al cerebro.....	31
1.2.4 Comunicación bidireccional entre el sistema circadiano y el sistema inmune...34	
1.2.4.1 Control circadiano del sistema inmune.....	34
1.2.4.2 Señalización desde el sistema inmune al reloj biológico.....	37
1.2.5 Un modelo de estudio para la interacción inmune circadiana: la administración de LPS intraperitoneal.....	40

<b>Bibliografía de la introducción general.....</b>	<b>44</b>
---	-----------

<b>Hipótesis y Objetivo General de la Tesis.....</b>	<b>49</b>
--	-----------

## **Capítulo 1: “Los astrocitos en la interacción inmune-circadiana”.**

<b>2.1 Introducción del Capítulo 1.....</b>	<b>53</b>
---	-----------

2.1.1 Tipos de células gliales.....	53
-------------------------------------	----

2.1.2 Los astrocitos.....	57
---------------------------	----

2.1.3 Los astrocitos y el reloj circadiano.....	59
---	----

2.1.4 Los astrocitos como mediadores inmune-circadianos.....	61
--	----

<b>Hipótesis y Objetivos del Capítulo 1.....</b>	<b>65</b>
--	-----------

## **2.2 Materiales y Métodos del Capítulo 1**

2.2.1 Animales.....	67
---------------------	----

2.2.2 Cultivos de explantos de NSQ.....	69
---	----

2.2.3 Cultivo celular.....	70
----------------------------	----

2.2.4 Experimentos con medios condicionados de astrocitos.....	71
--	----

2.2.5 Efectos de estímulos inmunes en la expresión de PER2 de astrocitos.....	76
---	----

2.2.6 Inmunofluorescencia de cultivos.....	77
--	----

2.2.7 Inmunohistoquímica de tejido de cerebro.....	78
--	----

2.2.8 Expresión de ARNm.....	78
------------------------------	----

2.2.9 Mediciones puntuales de actividad luciferasa.....	79
---	----

2.2.10 Mediciones de actividad $\beta$ -galactosidasa.....	79
--	----

2.2.11 Análisis de datos y estadística.....	80
---	----

## **2.3 Resultados del Capítulo 1**

2.3.1 Caracterización de los cultivos primarios de astrocitos de NSQ.....	85
2.3.2 Efectos de estímulos inmunes en la expresión de PER2 en astrocitos.....	86
2.3.2.1 Efectos sobre los ritmos de expresión en astrocitos Per2luc.....	86
2.3.2.2 Efectos sobre la expresión de PER2 en cultivos Wt.....	90
2.3.3 Efectos de los medios condicionados de astrocitos en la expresión de Per1....	91
2.3.5 Efectos de los medios condicionados de astrocitos en el reloj molecular de los NSQ.....	96
2.3.6 Efectos de los medios condicionados de astrocitos sobre el reloj circadiano in vivo.....	98

## **2.4 Discusión del Capítulo 1.....103**

## **Bibliografía del Capítulo 1.....111**

## **Capítulo 2: “El rol de CCL2 en la respuesta del reloj circadiano a la activación inmune”**

### **3.1 Introducción del Capítulo 2.**

3.1.1 La quimiocina CCL2 en el SNC.....	119
3.1.2 Ritmos circadianos en CCL2.....	123
3.1.3 CCL2 en astrocitos.....	124
3.1.4 CCL2 en la respuesta circadiana a estímulos inmunes.....	125

## **Hipótesis y Objetivos del Capítulo 2.....127**

### **3.2 Materiales y Métodos del Capítulo 2**

3.2.1 Bindarit.....	129
---------------------	-----

3.2.2 Animales.....	129
3.2.3 PCR en tiempo real.....	133
3.2.4 Medición de Quimiocinas y Citoquinas.....	134
3.2.5 Cuantificación de proteínas totales.....	134
3.2.6 Inmunofluorescencia de cortes de cerebro.....	134
3.2.7 Análisis Bioinformático.....	135
3.2.8 Análisis de datos y estadística.....	136

### **3.3 Resultados del Capítulo 2**

3.3.1 Expresión de CCR2 en los NSQ de ratón.....	139
3.3.2 Variación diaria en los niveles de Ccl2 y Ccr2 en los NSQ de ratón.....	141
3.3.3 Análisis bioinformático de la región promotora de Ccr2.....	143
3.3.4 Inducción de CCL2 y de citoquinas proinflamatorias en los NSQ de ratón en respuesta a LPS.....	145
3.3.5 Rol de CCL2 en la respuesta del reloj circadiano a LPS.....	146
3.3.6 Efectos de la inhibición de la síntesis de CCL2 en la sincronización fónica del reloj.....	147

### **3.3 Discusión del Capítulo 2.....149**

### **Bibliografía del capítulo 2.....155**

## **Capítulo 3: “Relación entre el reloj circadiano y los gliomas”**

### **4.1 Introducción del Capítulo 3.....161**

4.1.1 Biología general de los gliomas.....	162
4.1.2 El microambiente tumoral: su relación con microglía, astrocitos y células inmunes.....	164
4.1.3 El microambiente tumoral: rol de las citoquinas y quimiocinas.....	165

4.1.4 La progresión tumoral y el reloj circadiano: relación y enfoques cronoterapéuticos.....	169
---	-----

**Hipótesis y Objetivos del Capítulo 3.....173**

**4.2 Materiales y Métodos del Capítulo 3**

4.2.1 Animales.....	175
4.2.2 Tinción Hematoxilina-Eosina.....	177
4.2.3 Cultivo Celular.....	178
4.2.4 Registro de luminiscencia.....	178
4.2.5 Ensayos con Temozolomida.....	179
4.2.6 Análisis de datos y estadísticas.....	181

**4.3 Resultados del Capítulo 3**

4.3.1 Efectos de la implantación de gliomas hipotalámicos en la sincroización del reloj circadiano.....	185
4.3.2 Efectos de la implantación de gliomas hipotalámicos en los parámetros endógenos del oscilador circadiano.....	195
4.3.3 Ritmos circadianos en la respuesta a TMZ en la línea LN-229.....	203

**4.4 Discusión del Capítulo 3**

4.4.1 Alteraciones circadianas en un modelo de glioma hipotalámico.....	211
4.4.2 Regulación circadiana de la respuesta a TMZ.....	216

**4.5 Bibliografía del Capítulo 3.....221**

**5 Discusión y Conclusiones Generales.....227**

<b>Créditos.....</b>	<b>233</b>
<b>Anexo 1 “Ritmos de Actividad locomotora en ratones nude”.....</b>	<b>237</b>
<b>Anexo 2 “Introducción al Sistema Inmunológico”.....</b>	<b>247</b>

# Introducción General



## **1.1 Los ritmos circadianos en mamíferos.**

### **1.1.1 Hay tiempo para el tiempo (y un rato más).**

*“Alpha 60: ¿Cuál es su secreto? Dígame, Sr. Caution.*

*Lemmy Caution: Algo que nunca cambia, de día o de noche. El pasado representa su futuro. Se avanza en línea recta, sin embargo, termina cerrando el círculo.”*

Alphaville, de Jean-Luc Godard. 1965.

Resulta llamativo que un concepto tan ampliamente utilizado en nuestra vida como el tiempo, sea tan difícil de definir. Desde nuestros primeros años de vida nos empapamos de la idea del tiempo, aprendemos a discriminar sucesos que acaecieron antes o después en una línea temporal, diferenciamos el ayer del hoy y del mañana (aunque por suerte este último no nos desvele como lo hará años más tarde). La preocupación de la humanidad por el tiempo, consciente de que el mismo se le escurre, ha sido tomada desde diversos enfoques.

Tanto Aristóteles como Newton creyeron que el tiempo era una magnitud absoluta, por tanto, para ellos era posible medir el intervalo del tiempo entre dos sucesos sin ningún tipo de ambigüedad, siendo dicho intervalo exactamente igual para todos los observadores que lo midieran. Sin embargo, llegó el comienzo del siglo XX, y un desconocido empleado de una oficina de patentes suiza nos vino a sugerir que la idea de un tiempo absoluto debía ser tomada con cuidado. Según la teoría general de la relatividad de Einstein, el tiempo puede ser modificado por la gravedad, y deja de ser un absoluto, ya que además depende de la velocidad de movimiento de los objetos. Para algunos investigadores, entre los que se encuentra Ilya Prigogine, el tiempo es la dimensión perdida de la física, y son los procesos irreversibles (como muchas reacciones químicas) los que convierten el

flujo del tiempo en un aspecto objetivo del mundo, una flecha del tiempo<sup>1</sup>. La dirección de la flecha del tiempo ha sido también explicada mediante la segunda ley de la termodinámica, que establece que la entropía aumenta con el tiempo. Si un sistema ahora se encuentra lo bastante ordenado, es casi seguro que estará más desordenado en un momento futuro.

Más allá de las definiciones (o falta de ellas) científicas, desde algunas posturas filosóficas, como la de Paul Ricoeur, se pueden entender dos tiempos: un tiempo objetivo, que se da más allá de “nosotros” y que nos sucede, trasciende y excede, y también un tiempo subjetivo, dado que toda nuestra comprensión del tiempo está siempre determinada por nuestra conciencia y percepción del mismo.

La religión, por su parte, nos ofrece conceptos diversos sobre el tiempo, incluyendo la noción lineal (y teleológica) judeo-cristiana, con un principio y un fin (y finalidad) claros, y la repetición cíclica, con un empezar y un terminar que se suceden infinitamente, propia de los griegos, babilonios, hindúes y budistas. En la modernidad occidental, la concepción judeo-cristiana del tiempo persiste, y da fruto a una concepción del tiempo y de la historia basada en el progreso. El tiempo en el que transcurrimos tiene que dar frutos, de ahí el crecimiento de la idea del tiempo productivo, capaz de ordenar y sistematizar nuestras vidas, propio del capitalismo.

Existe, finalmente, un tiempo biológico, que nace y transcurre dentro de nuestro organismo (y del de cualquier ratón o bicho que ande por este planeta... no nos vayamos a creer tan especiales). Es más, nuestro tiempo (y el reloj que lo dicta) se acopla fuertemente con el tiempo cíclico del entorno en el que vivimos. Somos relojes andantes, capaces de medir el tiempo (pero no tanto de definirlo): veamos entonces de qué se trata este reloj, el reloj biológico, y cómo se relaciona con los ciclos del planeta en que vivimos.

---

<sup>1</sup> Prigogine, Ilya (1997). *The End of Certainty*.

### **1.1.2 Ciclos ambientales y ritmos biológicos.**

En el ambiente existen diversas claves temporales, determinadas por ciclos geofísicos que han marcado, a lo largo de la evolución, la vida en la Tierra. Por ejemplo, los ciclos lunares, que se completan cada 28 días, atravesando cuatro fases lunares. Además de los cambios de iluminación que vienen marcados por cada una de estas fases, la combinación entre las fuerzas gravitacionales del sol y de la luna determinan la sucesión de las mareas en las aguas costeras. Los ciclos de las mareas se completan cada 12,5 horas, aproximadamente, con un ciclo superpuesto de amplitud de las mareas de 14 días.

“Todo tiene un tiempo bajo el sol” nos afirmaban los integrantes de Vox Dei<sup>2</sup>, y no se equivocaban. La rotación terrestre, que genera ciclos en la exposición de la superficie terrestre al sol, es la unidad de tiempo que más fuertemente ha influenciado la vida de los humanos. En la actualidad el ciclo de rotación posee un período de 23 horas, 56 minutos y 4 segundos. Además, debido al movimiento de translación terrestre alrededor del sol y a la inclinación del eje de rotación terrestre, respecto a su plano de translación, se producen cambios estacionales con un período de 365,26 días. Los cambios estacionales están asociados, en latitudes por fuera del ecuador, a cambios en la duración de los períodos de luz y oscuridad o fotoperíodos. Los cambios en los fotoperíodos son muy estables para una latitud dada, y esto ha permitido que las plantas y animales utilicen dicha señal como marcador del paso de las estaciones. En resumen, los ciclos de mareas, los ritmos diarios y los cambios anuales son las claves temporales que afectan de modo más directo a los seres vivos.

Como consecuencia de las variaciones temporales en el ambiente, los seres vivos han desarrollado mecanismos capaces de medir el paso del tiempo, cubriendo la escala de centésimas de segundos, segundos a minutos, días, períodos de mareas y transiciones lunares y estaciones. Estos ritmos se clasifican según su frecuencia en ultradianos (de frecuencia superior a 24 horas), circadianos (con una frecuencia de cercana a 24 horas) e infradianos (de

---

<sup>2</sup> Del tema “Libros Sapienciales”, en el disco “La Biblia”, 1971.

frecuencia menor a 24 horas). En la **Tabla 1.1.1** se ejemplifican distintos casos de cada uno de ellos.

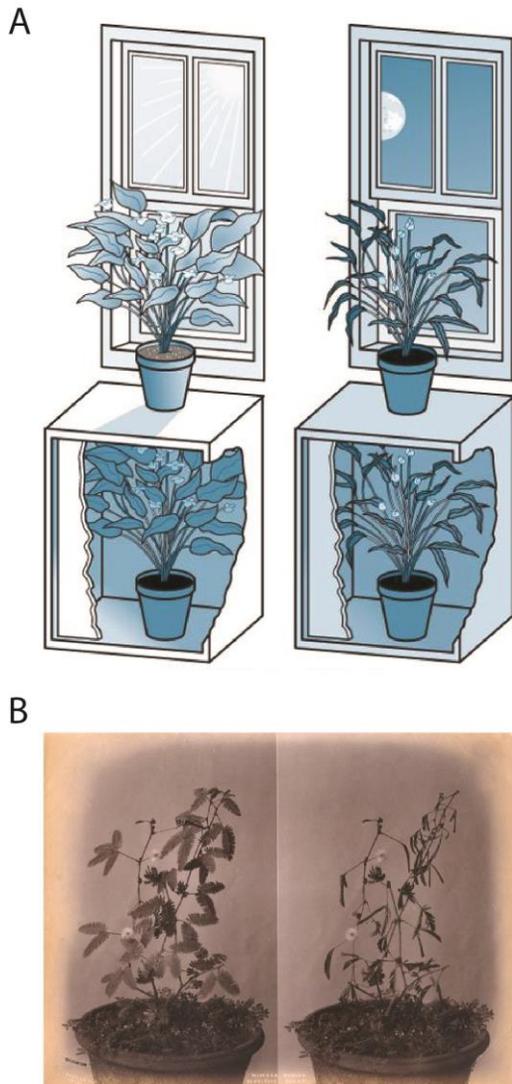
<b>Tipo de ritmo</b>	<b>Período</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Ultradiano</b>	0,1 segundos 1 segundo 6 segundos 60 minutos 90 minutos	Electroencefalograma Ritmo cardíaco Ritmo respiratorio Secreciones hormonales Alternancia de estados de sueño
<b>Circadiano</b>	24 horas	Actividad/ reposo Temperatura corporal
<b>Infradiano</b>	28 días 365 días	Ciclo menstrual Hibernación

**Tabla 1.1.1 Distintos tipos de ritmos biológicos.**

### **1.1.3 Breve historia de los ritmos biológicos: dicen que dicen que dijeron que...**

Dentro de la biología, la relación entre los seres vivos y su entorno temporal es estudiada por la Cronobiología. Si bien la cronobiología es una disciplina joven (las bases de su estudio se sentaron a mediados del siglo XX), la idea de que a la fisiología de los humanos no le es indiferente el momento del día o del año existe desde hace miles de años. Ya en la Grecia antigua, allá por el 700 a.C., Hesíodo notaba que “las enfermedades caen sobre los hombres, algunas de día y otras por la noche”. El mismo Hipócrates, padre de la medicina, aconsejaba a sus estudiantes “administrar las purgas de arriba hacia abajo en el verano, y de abajo hacia arriba en el invierno”. También de aquellos años datan las observaciones de ritmos en las plantas. Andróstenes, uno de los cronistas de las expediciones de Alejandro Magno, relató que las hojas y los pétalos de la planta de tamarindo se movían a lo largo del día “como saludando al sol”.

Más allá de estas notables observaciones, hubo que esperar varios siglos para encontrar el primer experimento cronobiológico propiamente dicho, pero que respondió a una de las preguntas fundamentales en la cronobiología. Tal como ya mencionamos, existe una gran variedad de plantas capaces de realizar movimientos variando su posición o estado a lo largo del día. Ahora bien, ¿son estos movimientos una simple respuesta pasiva a un ambiente periódico, o existe un mecanismo **endógeno** que las sostenga? Fue el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortous de Mairan quien a principios del siglo XVIII se abocó a responder esta pregunta. De Mairan observó que las hojas de la planta *Mimosa púdica* (que lo acompañaba en las largas horas que pasaba en el observatorio) se mantenían extendidas durante el día y retraídas durante la noche. La curiosidad acerca de la naturaleza de este movimiento llevaron al científico a realizar un experimento sencillísimo: colocar la maceta en un armario dentro del cual no llegaba la luz solar. Para su sorpresa, las hojas de la Mimosa se seguían moviendo, por lo que se demostró por primera vez que los ritmos circadianos eran capaces de mantenerse aún en ausencia de señales temporales del ambiente (**Figura 1.1.1**). Estos experimentos fueron continuados luego por De Monceau y De Candolle, que determinaron que el movimiento no dependía de variaciones en la temperatura ambiental y que ocurría con un período ligeramente diferente de 24 horas (22-23 horas). Estos incipientes trabajos en el campo de la cronobiología se complementaron con experimentos realizados con abejas. Los trabajos de Forel, von Frisch, Beling y Renner demostraron que estos insectos poseen una memoria del tiempo que los ayuda a encontrar sus fuentes de alimento siempre a la misma hora todos los días. Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo pasado cuando, gracias los trabajos de Colin Pittendrigh y Jürgen Aschoff, se llegó a una formalización de los mecanismos de los ritmos circadianos.



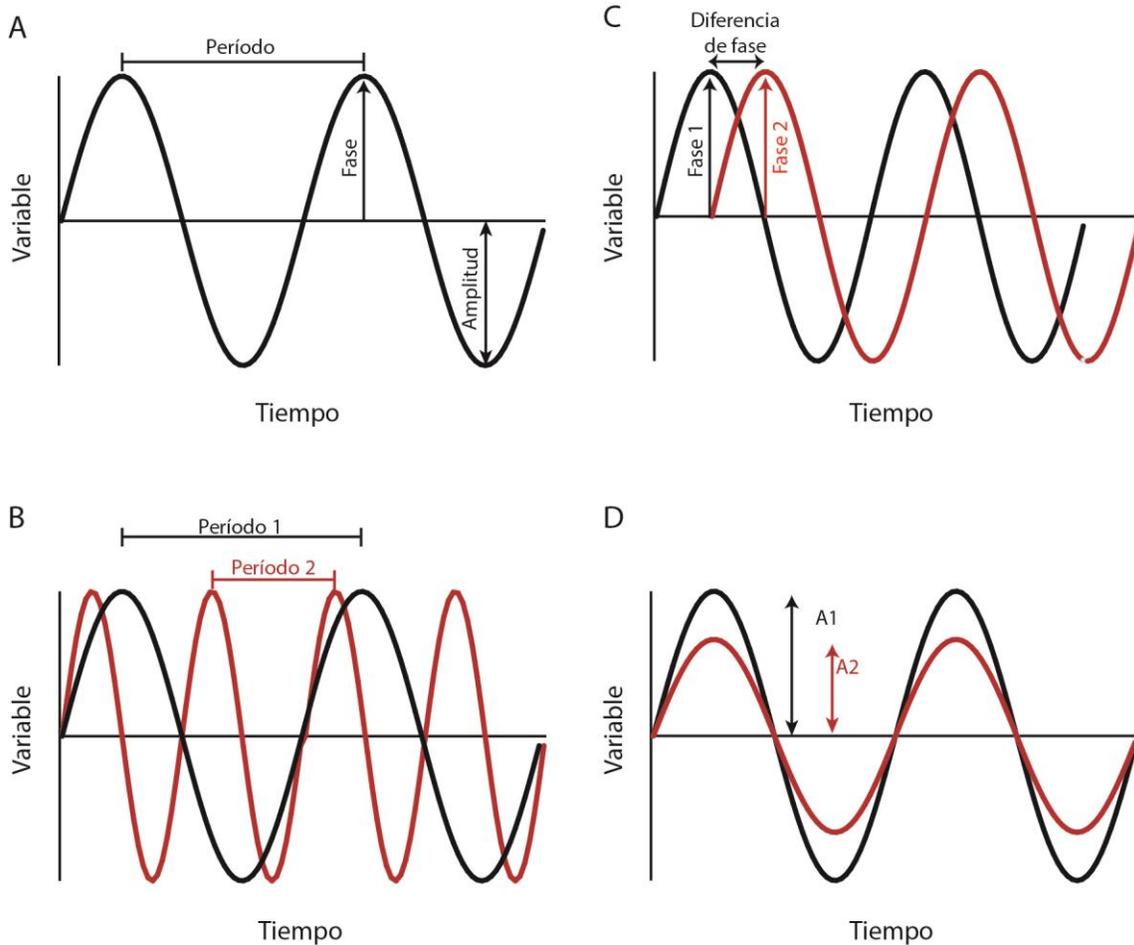
**Figura 1.1.1. Experimento realizado por el astrónomo francés De Mairan. A)**

Esquema del experimento. Como se muestra en la figura, las hojas de la mimosa se abren en presencia del sol y se cierran durante la noche. Cuando realizó esto mismo en ausencia de exposición a la luz del sol, la planta continuó exhibiendo los mismos movimientos en sus hojas. **B)** Imágenes de una *Mimosa pudica* durante el día o durante la noche.

#### 1.1.4 Variables oscilatorias.

Antes de comenzar nuestro recorrido por las distintas características de los ritmos circadianos, nos tomaremos un momento para definir muy brevemente qué parámetros se estudian para caracterizarlos. El estudio de oscilaciones biológicas se vale de definiciones y características que se utilizan a la hora de describir cualquier variable oscilatoria. Así, el Período ( $\tau$ , tau) es el tiempo que tarda una variable en completar un ciclo. La Amplitud ( $A$ ) es la diferencia entre el valor máximo y la media de la oscilación. La Fase ( $\psi$ ) corresponde al momento en que

la variable adquiere un valor determinado. Se puede tomar como valor de referencia cualquier punto del ritmo (el máximo –como en el caso de la figura-, el mínimo, etc.; **Figura 1.1.2 A**). Estos parámetros son muy utilizados cuando se comparan ritmos. En la **Figura 1.1.2 B**, se muestran dos ritmos que tienen distinto período, siendo el  $\tau_2$  menor al  $\tau_1$ . En la **Figura 1.1.2 C** se ejemplifica un cambio de fase ( $\Delta\psi$ ), que podría provenir de un mismo ritmo en distintos momentos (sin variaciones en el período ni en la amplitud). En este caso, la fase 2 aparece más tarde que la fase 1 y esto es lo que denominamos un retraso de fase. Por último, en la **Figura 1.1.2 D** se ejemplifican dos ritmos que tienen distinta amplitud, pero igual período.



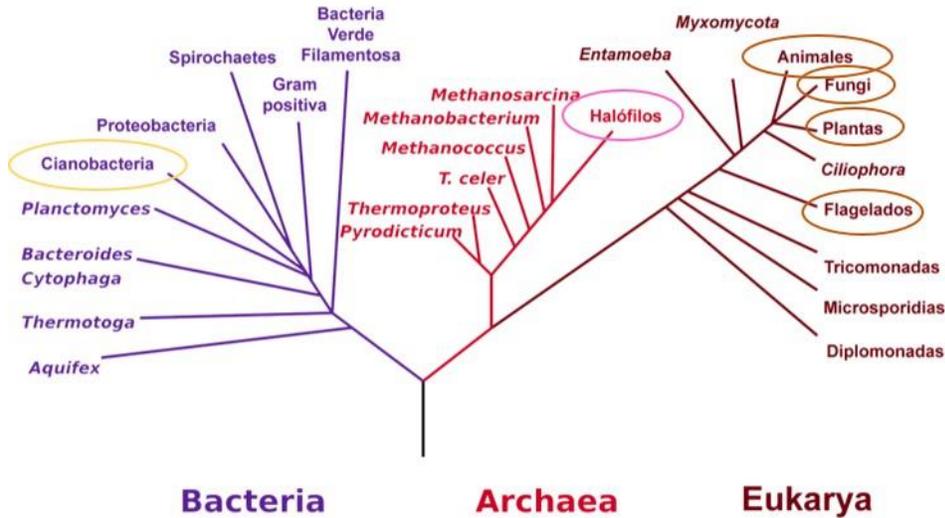
**Figura 1.1.2 (Página anterior). Características de una variable oscilatoria. A)** Componentes de estudio de una variable oscilatoria. **B)** Dos variables con diferente período. **C)** Dos variables con diferente fase. **D)** Dos variables con diferente amplitud.

### **1.1.5 Mecanismos generales de los ritmos biológicos: engranajes y agujas del reloj circadiano.**

La existencia de un reloj circadiano que permite anticipar coordinadamente los cambios ambientales que ocurren cada 24 horas está ampliamente distribuido en miembros de todos los dominios que agrupan a los seres vivos: Bacterias, Archea y Eukarya (**Figura 1.1.3**). De hecho, el mecanismo molecular (que describiremos más adelante) que permite la generación de los ritmos circadianos, se encuentra muy conservado en entre especies pertenecientes a distintos dominios.

Tal como se desprende de los experimentos de De Mairan, este oscilador circadiano es endógeno, es decir que es un mecanismo que permite predecir los cambios cíclicos que puedan ocurrir en el ambiente. De esta manera, los organismos pueden “prepararse” y anticiparse a lo que va a ocurrir en su entorno. Por ejemplo, un animal nocturno que pueda anticipar cuando aún hay luz en el ambiente, sin salir de su refugio, evita el riesgo de exponerse a predadores diurnos. Sin embargo, ante la posibilidad de la salida del animal en un horario equivocado, sería de utilidad que este reloj pudiese ajustarse (o “ponerse en hora”) de manera de evitar futuras errores en la anticipación del ciclo luz-oscuridad. El mecanismo por el cual el oscilador circadiano es capaz de modificarse en respuesta a claves ambientales externas se denomina sincronización.

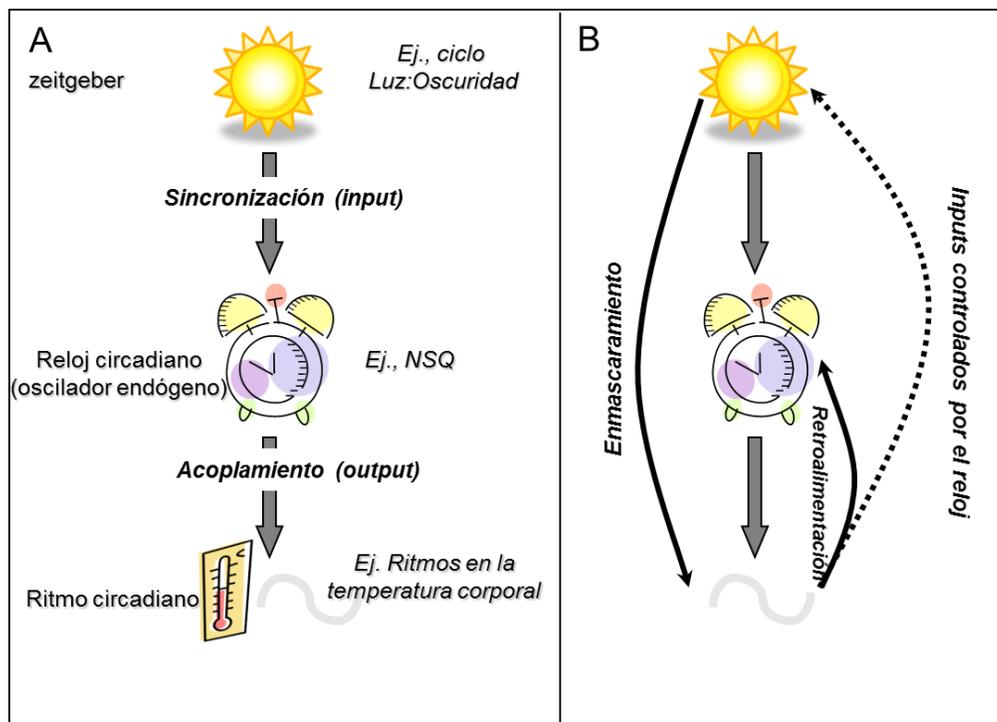
## INTRODUCCIÓN GENERAL



**Figura 1.1.3.** Existencia de ritmos circadianos en organismos pertenecientes a los tres dominios. Árbol filogenético donde se describen las subdivisiones de cada uno y se señala con un círculo en cuáles se han hallado ritmos circadianos (modificado de Dunlap, 1999).

El sistema circadiano compuesto por un oscilador endógeno, capaz de controlar variables fisiológicas y comportamentales, y, a su vez, capaz de sincronizarse a claves ambientales (o *Zeitgebers*, -del alemán, *zeit* = tiempo, *geber* = dador), suele representarse mediante un eskinograma, popularizado por Arnold Eskin (**Figura 1.1.4 A**). Dentro de los agentes sincronizadores del oscilador circadiano, los más importantes son el ciclo luz-oscuridad, la temperatura, los alimentos y, en el caso de los humanos, las claves sociales. Las variables controladas por el reloj circadiano son muchas, entre ellas podemos destacar los ritmos de actividad-reposo, de temperatura corporal, en los niveles de distintas hormonas, y, como veremos más adelante, variaciones en el funcionamiento del sistema inmunológico. El esquema original propuesto por Eskin fue complementado a lo largo del tiempo con otras interacciones entre cada uno de los componentes (**Figura 1.1.4 B**). Así, se ha descrito que un agente sincronizador es capaz de afectar directamente variables de salida (por ejemplo la luz es capaz de inhibir la actividad locomotora, independientemente de su efecto en el reloj), en un

fenómeno conocido como enmascaramiento. Algunos componentes controlados por el reloj biológico son, a su vez, capaces de actuar sobre el oscilador circadiano, tal es el caso de la hormona melatonina, cuya secreción por la glándula pineal está fuertemente regulada por el reloj, que es capaz de actuar sobre el reloj circadiano principal. Incluso existe un control circadiano de los mecanismos de entrada de factores de sincronización, como la variación circadiana en el funcionamiento de ciertos fotorreceptores, que a su vez determina una variación temporal en los efectos de este agente sincronizador sobre el reloj.



**Figura 1.1.4 A)** Eskinograma clásico. Un oscilador o reloj endógeno es modificado por un agente sincronizador (proceso denominado sincronización) y esto controla la variable de salida o ritmo biológico en un proceso denominado acoplamiento. **B)** Asimismo, el agente sincronizador puede modificar directamente la variable de salida, proceso denominado enmascaramiento. La salida puede modificar al sincronizador (retroalimentación) o controlar la sensibilidad o exposición a los *inputs*.

Finalmente, otra característica de los ritmos circadianos es que exhiben compensación por temperatura, esto es, que mantienen su período en presencia de temperaturas ambientales diversas. De esta manera un organismo puede mantener oscilaciones de un período adecuado, independientemente de la temperatura (más allá de que la misma pueda afectar transitoriamente al oscilador durante la sincronización).

En resumen, un oscilador circadiano cumple con tres características:

- 1- Es capaz de mantener oscilaciones en ausencia de claves temporales externas.
- 2- Es capaz de sincronizarse a un ciclo ambiental de forma estable.
- 3- Presenta compensación por temperatura.

#### **1.1.6 Métodos de estudio de ritmos biológico. Lo que no debe faltar en la caja de herramientas de todo cronobiólogo.**

Más allá del conocimiento que podamos tener acerca de las características y mecanismos que componen un determinado ritmo biológico, resulta evidente que la caracterización formal y la cuantificación del mismo son aspectos de suma importancia desde el punto de vista práctico.

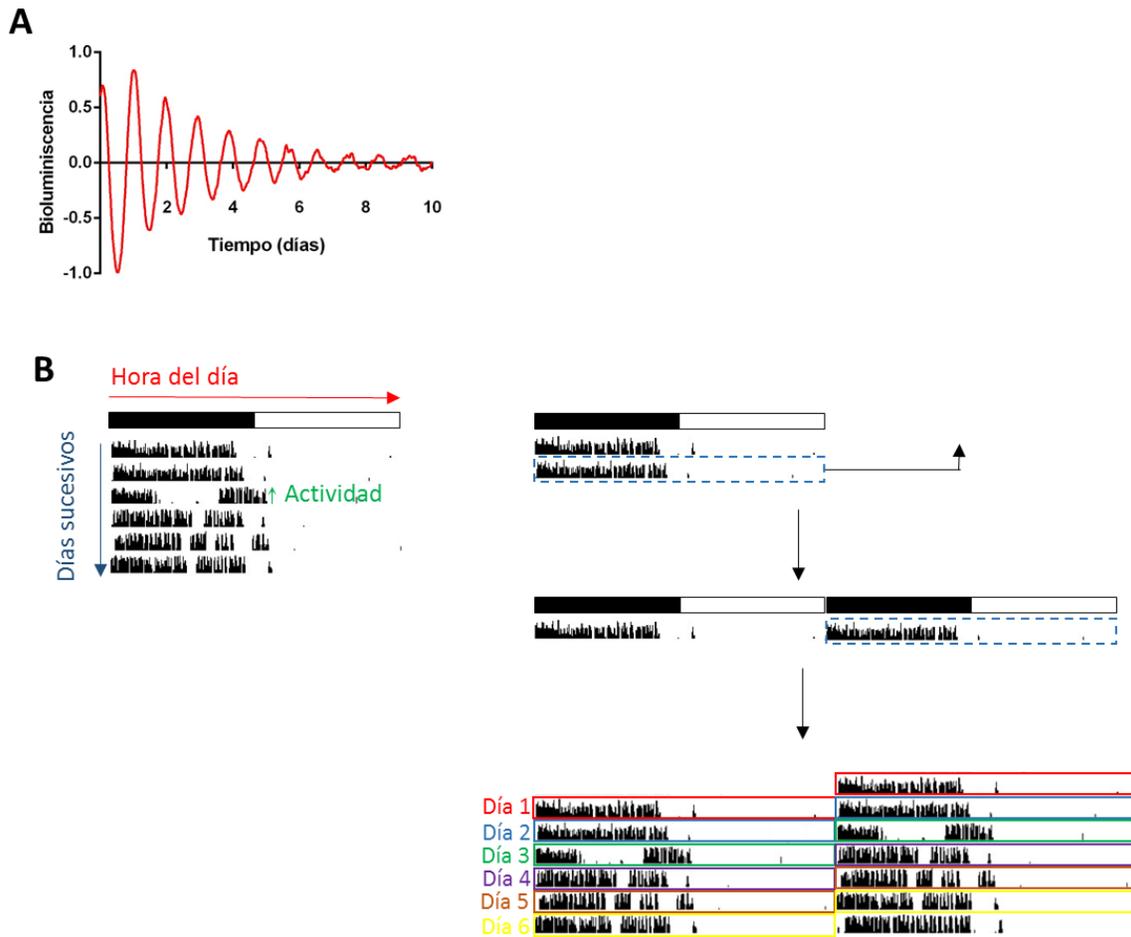
Primero que nada, mencionaremos que en estudios cronobiológicos es muy común mantener a los animales bajo un ciclo controlado de luz:oscuridad (L:O), de modo de que los ritmos se encuentren sincronizados al mismo. En estas condiciones hablaremos de ritmos diarios, y a las horas se las denominará como hora del *zeitgeber*, se divide el día en 24 horas, y a cada una de ellas se las denomina como "ZT" (por *zeitgeber time*), siendo ZT 12 el momento de apagado de las luces (cuando los animales nocturnos comienzan su actividad), y, consecuentemente ZT 0 cuando las luces se encienden. Así, por ejemplo, si un animal es mantenido en un ciclo L:O de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (12:12), con el apagado de las luces (ZT 12) a las 20:00 horas reloj, un tratamiento

aplicado a las 23:00 hora reloj, corresponde a ZT 15, y uno realizado a las 11:00 hora reloj, a ZT 3.

Para estudiar los ritmos circadianos propiamente dichos (aquellos determinados por el reloj endógeno), los animales se colocan en condiciones de oscuridad constante - O:O - y el día se divide en 24 “horas circadianas” (o CT, por *circadian time*). Para calcular la duración de cada una de estas horas, se divide el período de la variable de salida (por ejemplo la actividad locomotora) en condiciones constantes, por las 24 horas de un día reloj. De esta manera, en condiciones O:O, se toma como punto de referencia el momento en el que se inicia la actividad locomotora del animal, y se la define como CT 12, y el resto de las horas circadianas se expresan relativas a ese horario. Además, se denomina como “día subjetivo” al momento en el que el animal se encuentra en su fase de reposo (para un animal nocturno), y “noche subjetiva” cuando el animal se encuentra en su fase de actividad. Así, por ejemplo, un tratamiento realizado a CT 15 (3 horas después del inicio de la actividad), corresponde a un tratamiento realizado en las primeras horas de la noche subjetiva (noche subjetiva temprana).

Existen diversas maneras de representar los datos a la hora de estudiar los ritmos circadianos. Si se dispone de series temporales cortas (por ejemplo que abarquen pocos días de muestreo), la representación cartesiana de las mismas puede ser útil para detectar visualmente la presencia de periodicidades (**Figura 1.1.5 A**). Sin embargo, si se trata de series muy largas (decenas de días, o meses), resulta más difícil estudiar algún tipo de estructura en un simple gráfico cartesiano. Una herramienta muy útil para estudiar este tipo de datos es el uso de actogramas, particularmente de los actogramas de doble gráfica. En estos gráficos suele representarse la actividad de un animal (de allí su nombre, aunque pueden utilizarse para graficar cualquier variable que se quiera caracterizar circadianamente) a lo largo de un día, con rayas verticales que representan las cuentas de actividad en un momento dado. Los días sucesivos de registro se representan uno debajo del otro, y, en el caso de los de gráfica doble, se colocan también uno a continuación del otro, de a dos días, y luego uno debajo del otro (en

la **Figura 1.1.5 B** se trata de ejemplificar la construcción de un actograma). Estas gráficas resultan de gran utilidad, ya que permiten una detección sencilla de los “onsets” (momentos de inicio de la actividad) en cada día, así como de la fase y período de los ritmos. Otro tipo de gráfico, que resume los patrones de actividad de muchos días, es el de *waveform* en los que la actividad para cada punto de la serie temporal diaria se promedia entre muchos días de registro, y se grafica en el eje y, con las horas del día (o las horas circadianas) en el eje x.



**Figura 1.1.5 A) Gráfica cartesiana:** Ejemplo de una variable con oscilaciones circadianas graficada en un esquema de ejes cartesianos simple. **B) Construcción de un actograma. Panel superior izquierdo:** Actograma de *ploteo simple*. Típico gráfico de un ritmo de actividad locomotora real, durante seis días.

**Figura 1.1.5 B) (Continuación) Panel derecho:** Construcción de un actograma *double plot*: se “corta” el día 2 y se pone a la derecha del día 1. Este procedimiento se repite con los días sucesivos: con las horas del día en el eje x y días sucesivos en el eje y (cada día está representado con un color diferente). Así, cuando termina el día 1, comienza (al lado) el día dos.

Finalmente, existe una gran batería de herramientas estadísticas que son imprescindibles a la hora de caracterizar parámetros de los ritmos circadianos. Entre ellos, mencionaremos los análisis de transformada de Fourier, seguidos de periodogramas (Refinetti et al. 2007). Estos análisis computan el peso de distintos períodos en una serie temporal y permiten encontrar aquellos que mejor describen a la variable rítmica. En esa misma línea, el análisis por *wavelet* permite describir la amplitud y el período de una serie temporal, pero ajustando funciones instantáneas y, a diferencia de la estadística al realizar la transformada de Fourier, puede detectar cambios en el período de la variable cíclica en un mismo análisis (Leise 2013).

### **1.1.7 El sistema circadiano de mamíferos: el reloj endógeno.**

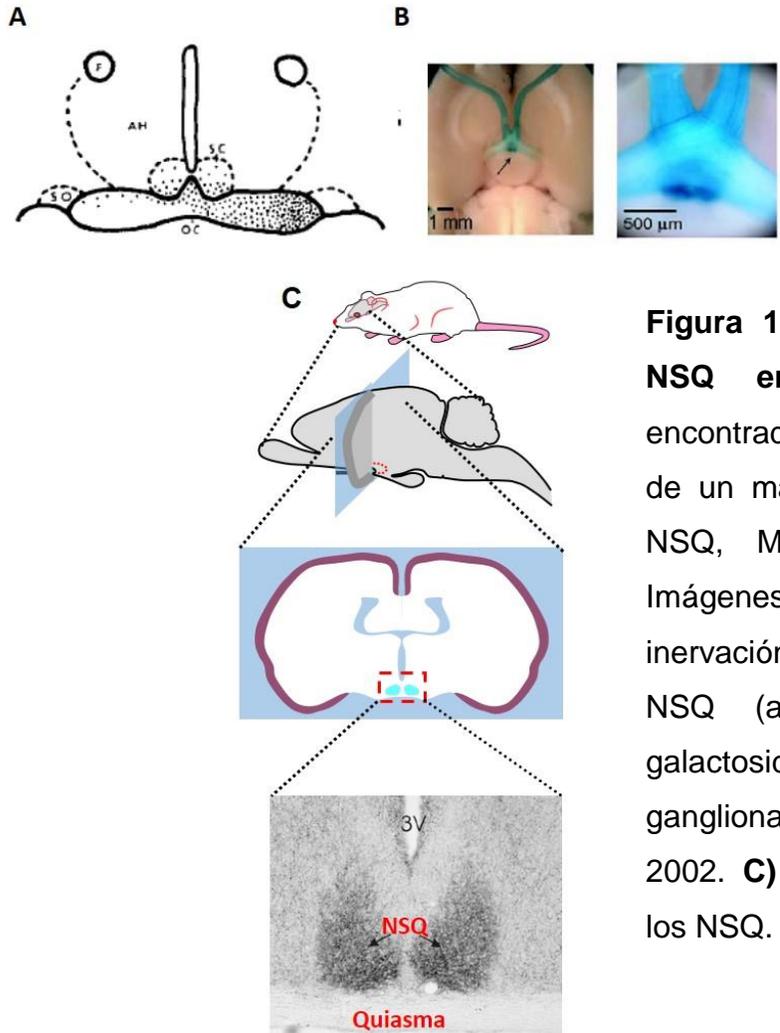
#### **1.1.7.1 Localización anatómica. Señoras y señores, con ustedes: ¡los Núcleos Supraquiasmáticos!**

Una vez aceptada la existencia de un reloj endógeno, el siguiente gran objetivo en el campo de la cronobiología fue el de localizarlo (pese a que “allá en el fondo – del reloj- está la muerte”, los cronobiólogos no tuvieron miedo<sup>3</sup>). Uno de los primeros acercamientos a este problema fue el realizado por Curt Richter, a principios del siglo XX. Richter se abocó a localizar el reloj biológico de ratas realizando lesiones o extirpando áreas cerebrales y viendo qué efectos tenían estos tratamientos sobre los ritmos circadianos. Así es como llegó a concluir que existen áreas hipotalámicas que son, probablemente, las responsables de la

---

<sup>3</sup> Julio Cortázar. Instrucciones para dar cuerda al reloj. En: Historias de Cronopios y de Famas. 1962.

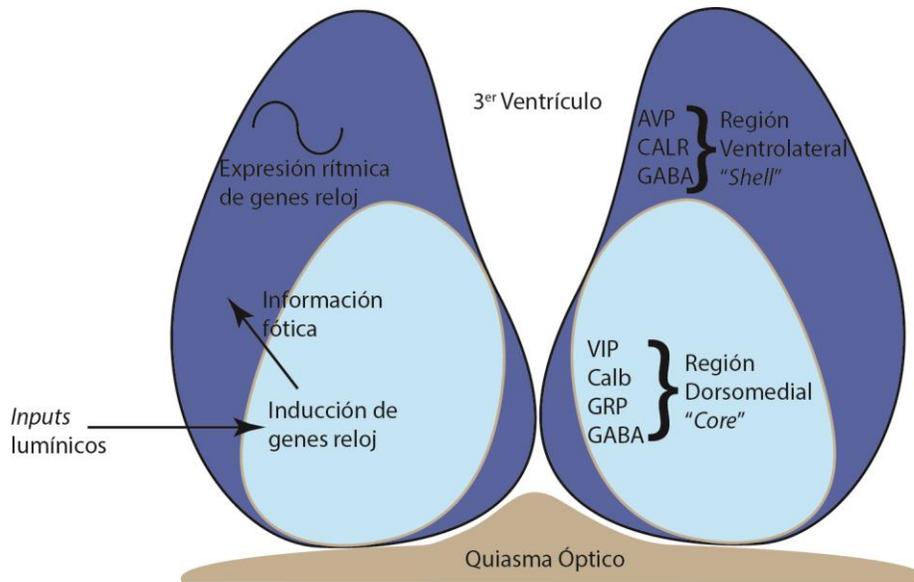
generación de los ritmos circadianos. El siguiente paso en la localización del reloj vino de la mano de la utilización de marcadores anterógrados. Dado que la luz es el principal sincronizador del reloj circadiano, Moore y Lenn decidieron administrar un marcador postsináptico en los ojos y localizar el destino de la proyección. Tal como se observa en la **Figura 1.1.6 A**, los investigadores encontraron una importante marcación en unos pequeños núcleos ubicados justo por encima del quiasma óptico, llamados núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Moore & Lenn 1972). Experimentos posteriores mostraron que la ablación de estos núcleos lleva a la pérdida de los ritmos circadianos, y que los mismos pueden funcionar como osciladores incluso aislados del resto del cuerpo (Stephan & Zucker 1972; Inouye & Kawamura 1979). La confirmación de la importancia de los NSQ en el sistema circadiano vino de la mano de experimentos de trasplante. Se encontró que la arritmicidad producida por la ablación de los NSQ se recuperaba mediante el trasplante de NSQ fetales (Drucker-Colín et al. 1984). La demostración definitiva de la función de marcapasos de los NSQ vino dada por experimentos realizados por Martin Ralph en el laboratorio de Michael Menaker. Los investigadores se valieron de una cepa mutante de hamsters, denominados *tau* cuyo período es significativamente más corto que el de la cepa salvaje. Al trasplantar NSQ fetales de estos animales en animales de cepa salvaje, a los que previamente se les había lesionado los NSQ, observaron que los animales trasplantados recuperaron la ritmicidad pero con el período correspondiente al NSQ del donante. Análogamente, al trasplantar NSQ de cepa salvaje en animales *tau*, la cepa receptora adoptó los parámetros circadianos correspondientes a los NSQ donantes (Ralph et al. 1990). Desde entonces, un enorme número de trabajos han confirmado el rol de los NSQ como marcapasos, el que representa uno de los correlatos más fuertes de localización funcional en una única estructura cerebral.



**Figura 1.1.6 Localización de los NSQ en roedores.** **A)** Marca encontrada luego de la administración de un marcador en la retina (SC = NSQ, Moore & Lenn 1972) **B)** Imágenes de NSQ evidenciando la inervación de células retinianas en los NSQ (azul, actividad de beta-galactosidasa expresada en células ganglionares). Modificado de Hattar 2002. **C)** Localización anatómica de los NSQ.

Los NSQ se encuentran por encima del quiasma óptico, en contacto con el extremo ventral del tercer ventrículo, en el hipotálamo anterior (**Figura 1.1.6 C**). Estos núcleos son muy compactos, y en roedores contienen alrededor de 10.000 neuronas cada uno. Los NSQ, a pesar de su pequeño tamaño, poseen una gran heterogeneidad dándoles una asombrosa complejidad. Clásicamente, los NSQ se subdividen en dos regiones, determinadas por características neuroanatómicas, electrofisiológicas e histoquímicas: una zona ventrolateral, también llamada “*core*”, de alta densidad celular, alta densidad de terminales del TRH, alto contenido del péptido vasoactivo intestinal (VIP) y del péptido liberador de gastrina (GRP); y una zona dorsomedial, también denominada “*shell*”, que presenta alto contenido de

calbindina (CALB), arginina vasopresina (AVP) y menor densidad de aferencias retinianas (**Figura 1.1.7**; (Abrahamson & Moore 2001)).



**Figura 1.1.7. Características neuroanatómicas de los NSQ de ratón.** Distribución esquemática de las regiones de uno de los NSQ resaltando la expresión de neuropéptidos. La región *core* responde en forma aguda a los *inputs* lumínicos mediante la inducción de genes reloj. La información es luego transmitida a la región *shell*, donde se altera la expresión rítmica de los genes reloj.

La capacidad de los NSQ de generar y mantener ritmos circadianos es una propiedad intrínseca de las células que los componen. Las neuronas de los NSQ son capaces de generar y mantener ritmos, aun aisladas en cultivos dispersos. Sin embargo las características de las oscilaciones de las NSQ (por ejemplo su período) dependen de la comunicación entre las células de los núcleos, siendo una propiedad de las redes neuronales que lo conforman. Los mecanismos que permiten la comunicación y el acoplamiento entre las células de los NSQ no están completamente caracterizados, aunque se conoce que el péptido VIP posee un rol importante en la misma (ver: Welsh et al. 2010 para una revisión sobre este tema).

### 1.1.7.2 Bases moleculares del reloj endógeno. Los engranajes del reloj molecular.

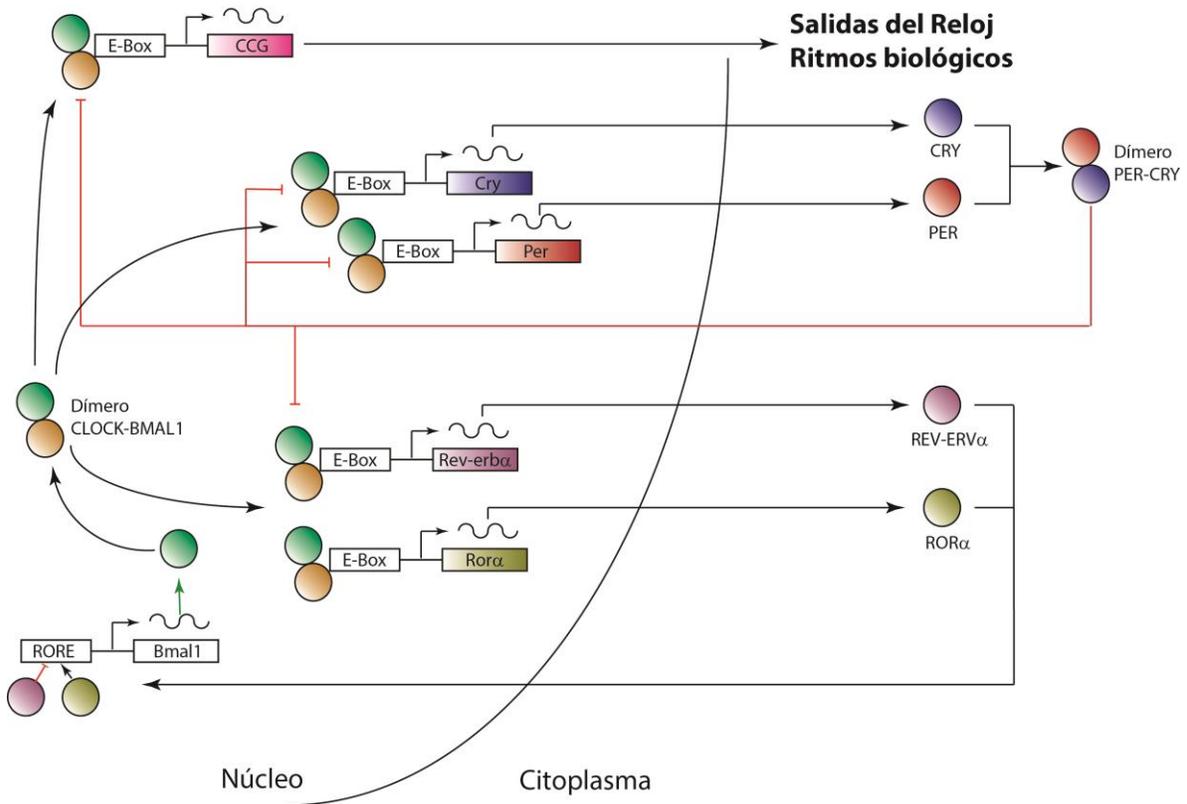
Ya hemos descrito dónde se encuentra localizado nuestro reloj circadiano principal y sabemos que, si bien requieren comunicarse entre sí, las células de los NSQ pueden funcionar como pequeños relojes individuales. Cabe entonces preguntarse: ¿cuál es el mecanismo intracelular que permite generar y mantener estas oscilaciones?

Las estrategias utilizadas para encontrar los mecanismos moleculares responsables de las oscilaciones circadianas fueron diversas. Sin embargo, la genética directa fue la herramienta que realizó los mayores aportes en este campo de la cronobiología. El trabajo seminal que describió el primer gen partícipe del reloj molecular fue realizado a principios de la década de 1970 por Ronald Konopka y Seymour Benzer y llevó a la descripción del locus *Per* como componente importante del reloj molecular en *Drosophila* (Konopka & Benzer 1971). Los trabajos con las moscas mutantes para *Per* establecieron no sólo que la ritmicidad circadiana tiene un sustento genético, sino que constituyeron la primera evidencia de que mutaciones puntuales pueden modificar el comportamiento de un animal.

La aparición del mutante circadiano *tau* en hamsters, casi 20 años más tarde, dio muestra de que el componente genético de los ritmos circadianos también existía en mamíferos. El equipo de Joseph Takahashi se abocó a la búsqueda de los genes responsables del comportamiento rítmico en ratones. Haciendo un *screening* de los fenotipos circadianos obtenidos por mutagénesis al azar fue que en 1994 describieron el mutante *Clock* (por *circadian locomotor activity output cycles kaput*). El fenotipo descrito consistía en un período anormalmente largo (28 horas). Con el correr de los años, se fueron descubriendo muchos otros genes cuyos productos son necesarios para la generación y mantenimiento de los ritmos circadianos (Lowrey & Takahashi 2011).

La descripción de los genes que formaban parte del oscilador molecular, y de cómo interaccionan y se comportan sus productos, llevó a completar el modelo del reloj molecular. El mismo consiste en un ciclo de retroalimentación negativa, en el que componentes positivos promueven la transcripción de los elementos negativos que, al acumularse, reprimen su propia síntesis. En mamíferos, los componentes positivos del ciclo están dados por las proteínas CLOCK y BMAL1 (*brain and muscle aryl hydrocarbon receptor translocator –like1*), que pertenecen a la familia de factores de transcripción (bHLH)-PAS (*Per-Arnt/AhR-Sim basic helix-loop-helix*). Estas proteínas reconocen secuencias regulatorias E-box (CACGTG) y E'box (CACGTT), y activan la transcripción de los genes que se encuentren río abajo de la misma. Entre estos genes encontramos a los elementos negativos del reloj: Per (*Period*) 1 y 2 y Cry (Cryptochrome) 1 y 2. Cuando las proteínas PER (1 o 2) y CRY (1 o 2) se heterodimerizan, ingresan al núcleo e inhiben la activación de su propia transcripción (y la de todos los genes que estén controlados por CLOCK y BMAL1) (**Figura 1.1.8**).

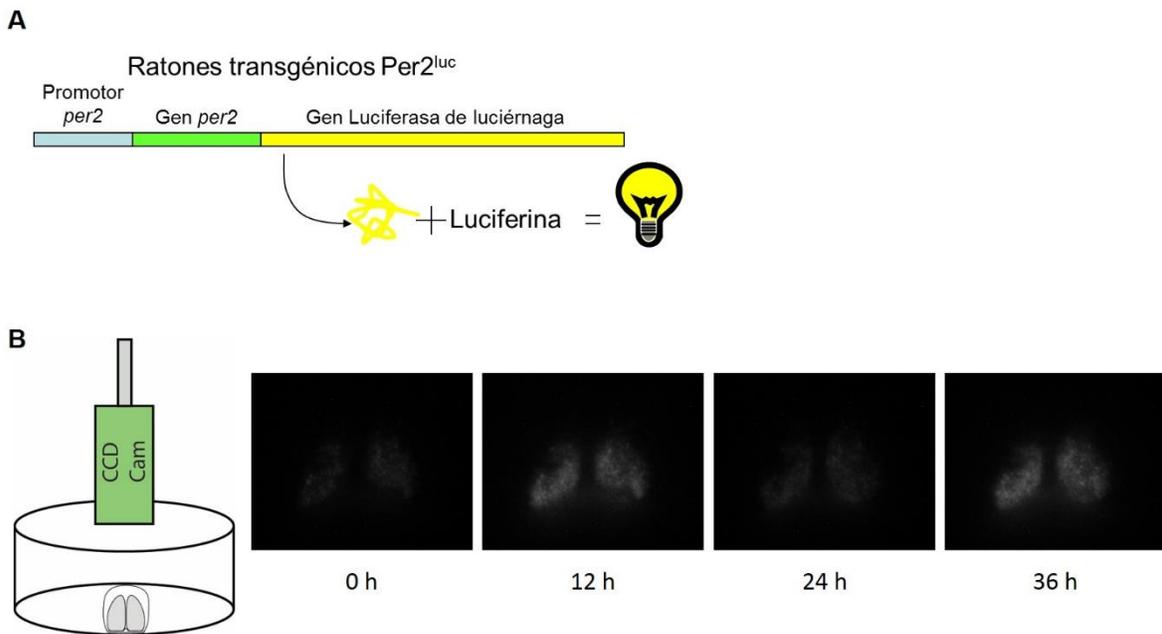
## INTRODUCCIÓN GENERAL



**Figura 1.1.8. Mecanismos de generación de ritmos circadianos a nivel molecular.** Los dos ciclos de retroalimentación más importantes se muestran en la figura: el dímero CLOCK-BMAL1 activa la transcripción de diversos genes, entre ellos Per, Cry, Rev-Erb $\alpha$  y los genes controlados por reloj. Las proteínas PER y CRY heterodimerizan y, en el núcleo, se unen a CLOCK-BMAL1 inhibiendo la transcripción de los genes que tienen E-box. Este *loop* sumado a la inhibición de la transcripción de Bmal1 por Rev-Erb $\alpha$ , las modificaciones post-traduccionales de PER y CRY, y la degradación regulada de las proteínas reloj, hacen que el ciclo se repita manteniendo un período de aproximadamente 24 h.

Estas características del oscilador circadiano molecular han permitido el desarrollo de importantes herramientas genéticas, que facilitan los estudios cronobiológicos. Además de los mutantes ya mencionados, en los que la función o la expresión de un gen reloj se encuentra comprometida, existen modelos en los

que la expresión de estos genes puede seguirse mediante reporteros. Así, por ejemplo, en los ratones  $Per2^{luc}$ , desarrollados en el laboratorio de Joseph Takahashi (Yoo et al. 2004), la luciferasa de luciérnaga se encuentra fusionada a la proteína PER2. Esto permite, mediante el uso de luminómetros especiales, seguir la expresión de PER2 en tiempo real, a lo largo de muchos días. Incluso, si la detección se realiza mediante una cámara fotográfica de alta sensibilidad, se puede tener una resolución espacial suficiente como para seguir la expresión de PER2 en células individuales, durante varios días (**Figura 1.1.9**).

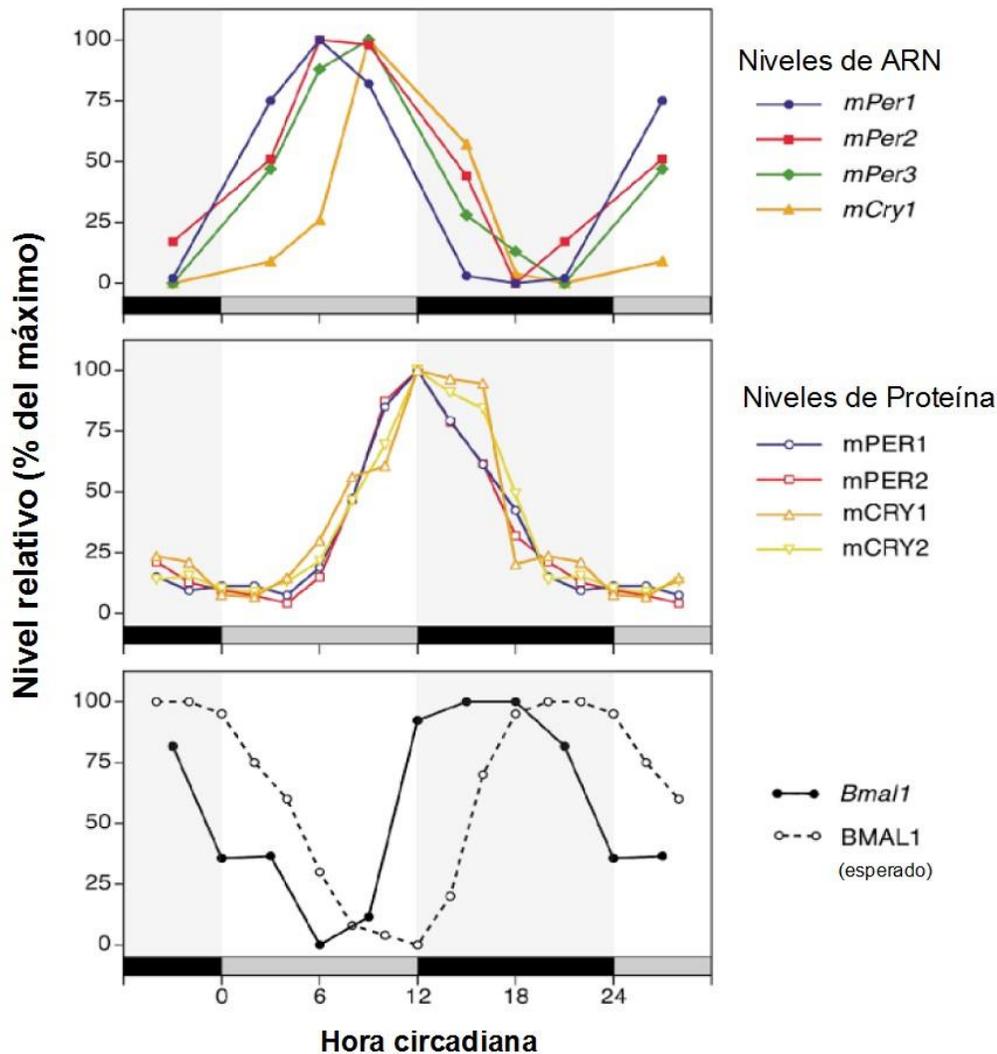


**Figura 1.1.9 Utilización de reporteros en cronobiología. A)** Esquema de la fusión del gen *Per2* con la luciferasa de luciérnaga en los ratones  $Per2^{luc}$ . **B)** Imágenes de la luminiscencia emitida por rebanadas coronales conteniendo los NSQ de ratones  $PER2^{luc}$ .

Más allá de este ciclo “base” de retroalimentación, existe un control complementario dado por la activación por parte de CLOCK-BMAL1 de la transcripción de *Rora* y *Rev-erba* (que también se ve reprimida por PER-CRY). Los productos proteicos de estos genes activan e inhiben, a su vez, la

transcripción de *Bmal1*, respectivamente, mediante unión a sitios RORE (**Figura 1.1.8**).

De esta manera, los niveles de ARNm y de proteínas de los componentes del reloj molecular oscilan (con la excepción de *Clock*) en un gran número de células. En particular en los NSQ los niveles de ARNm de *Per1-2* y *Cry1-2* se encuentran altos durante el día, mientras que los de *Bmal1* presentan su pico en la primera mitad de la noche (**Figura 1.1.10**). La oscilación en la activación de las secuencias promotoras E-box y RORE, dadas por CLOCK-BMAL1, y por ROR $\alpha$  y REV-ERB $\alpha$ , respectivamente, produce ritmos en la transcripción de una gran variedad de genes, más allá de los componentes del reloj molecular. Estos genes controlados por el reloj (*ccg*, por sus siglas en inglés) forman parte de la salida del reloj, que a través de este (y otros) mecanismos genera una oscilación a niveles transcripcionales de alrededor de un 15 - 20% del total del genoma.



**Figura 1.1.10 (Página anterior).** Niveles de ARNm y proteína de algunos genes reloj en los NSQ de ratón a lo largo de un “día circadiano”. En el caso de la proteína BMAL1 se grafican los niveles esperados según el patrón de expresión del ARNm (modificado de Madrid y Rol de Lamas, 2006).

Más allá del ciclo transcripcional-traduccionaL de retroalimentación (*TTFL* por sus siglas en inglés) existen niveles adicionales de control del reloj circadiano molecular. Existe por ejemplo un fuerte control de la expresión génica dada a nivel epigenético, y se ha postulado que la modificación de histonas es una parte fundamental del control circadiano de la transcripción. También existe un control a nivel postranscripcional, dado por los micro-ARNs y por las proteínas de unión a ARN, que son capaces de modular los transcritos de ciertos genes reloj. Además, ciertas modificaciones postraduccionales (tales como fosforilación, acetilación, metilación, SUMOilación y ubiquitinación) son capaces de modular la actividad y vida media de los componentes del reloj circadiano (Lowrey & Takahashi 2011; Orozco-Solis & Sassone-Corsi 2014).

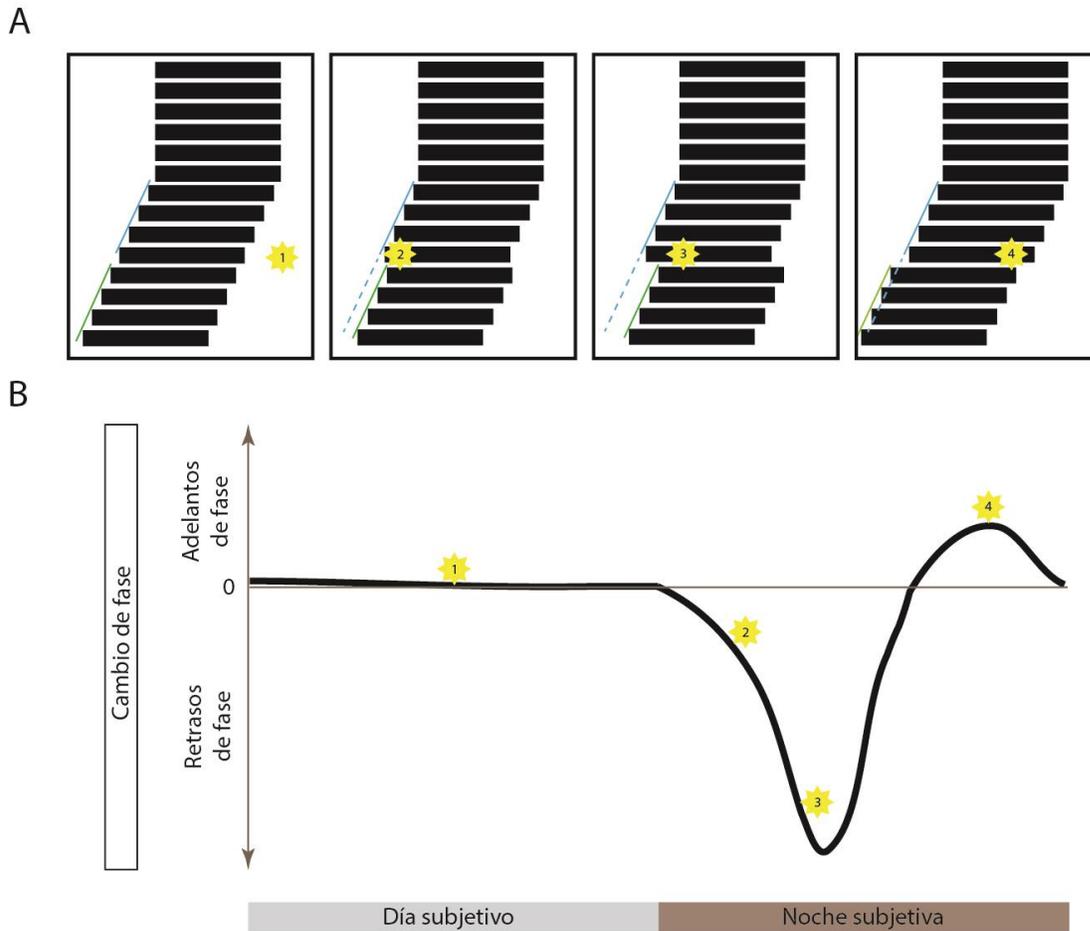
Finalmente, cabe señalar que se han descrito sistemas que permiten la generación de ritmos circadianos (por ejemplo en el estado redox de la célula) y que son independientes del TTFL, abriendo las puertas al estudio de nuevos mecanismos moleculares del reloj biológico (Robinson & Reddy 2014).

### **1.1.8 El sistema circadiano de mamíferos: la sincronización.**

La existencia de un reloj biológico hace que la expresión de un ritmo sea posible aún en la ausencia de claves o ciclos ambientales, en una situación de libre curso. Sin embargo, no debemos olvidar que la gran mayoría de las especies vive en ambientes cíclicos, y la existencia de un reloj biológico sólo tendría sentido adaptativo si el ritmo endógeno se pudiese ajustar a los ciclos ambientales. Así, en presencia de un *zeitgeber* (o agente sincronizador), el reloj biológico tiene su período y su fase ajustados finamente al ciclo ambiental, en un proceso conocido como *sincronización*. Así, por ejemplo, un ratón, que posee un período endógeno

menor que 24 horas, al estar sujeto a un ciclo de L:O de 24 horas, se sincroniza al mismo, y adopta el período del *zeitgeber*.

En el transcurso del siglo XX se realizaron una enorme cantidad de experimentos para entender las características y los mecanismos del proceso de sincronización. Los primeros experimentos mostraron que el sistema circadiano no es igualmente sensible a la luz a cualquier hora del día. Así, por ejemplo, si un ratón, mantenido en condiciones O:O, recibe un pulso de luz durante la noche subjetiva temprana, se producirá un retraso en la fase del oscilador circadiano. Contrariamente, si el pulso es administrado durante la noche subjetiva tardía se producirá un pequeño adelanto en la fase, y si el estímulo cae durante el día subjetivo no se observarán efectos en la fase. Estos hallazgos se resumen en la curva de respuesta de fase (CRF) (**Figura 1.1.11**), que muestra cómo es afectada la fase del reloj ante un estímulo aplicado en diferentes momentos del ciclo circadiano. De hecho, la CRF permite entender uno de los dos mecanismos principales de sincronización de los ritmos circadianos: la sincronización no paramétrica. Este mecanismo permite que si el organismo se expone a la luz en algún momento en el que el reloj circadiano se encuentra en fase nocturna, el mismo se corrija de modo de evitar futuras exposiciones no “deseadas”. Por ejemplo, si un animal nocturno abandona su cueva con anterioridad a la puesta del sol, recibirá un estímulo fótico en las primeras horas de la “noche subjetiva” del reloj circadiano. Este responde retrasando su fase, de manera que, al día siguiente, la salida de la cueva se produzca más tarde que el día anterior, y así se evite la exposición a la luz. Por el contrario, si el animal se expone a la luz durante la noche tardía (porque demoró demasiado en retornar a su refugio), al adelantar su reloj, estará en fase de manera más rápida.



**Figura 1.1.11.** Curva de respuesta de fase. En el panel superior se muestran cuatro actogramas diferentes. Cada uno de ellos representa la actividad de un animal a lo largo de 24 h durante 6 días en L:O y el resto en O:O. En el día y hora señalados en cada uno de los actogramas se trató a los animales con pulsos de luz. La fase previa y posterior al estímulo se señala con líneas celestes y verdes, respectivamente. La diferencia entre ambas fases determina el cambio de fase. Cuando estos datos de  $\psi_1 - \psi_2$  se grafican en el eje y versus el CT de administración del pulso, se construye la CRF. Los puntos correspondientes a los actograma 2 y 3 representan retrasos de fase, mientras que los correspondientes al actograma 4, adelantos. En 1, no hay cambios de fase.

La luz es también capaz de afectar los ritmos mediante el mecanismo de sincronización paramétrica. En este caso, la presencia del sincronizador en forma cíclica (o incluso en condiciones de luz constante, en que la intensidad lumínica podrá afectar el período del ritmo) es lo que sincroniza los ritmos: no se altera la fase sino el período de la oscilación.

En mamíferos la sincronización fótica depende de la llegada de la señal de presencia o ausencia de la luz a los NSQ. La misma está garantizada por la comunicación anatómica directa entre los NSQ y la retina (estructura especializada en la fotorrecepción), a través del TRH. La estimulación lumínica provoca la liberación de glutamato de las terminales del TRH, que actúa sobre los NSQ. A través de mecanismos que aún no se encuentran completamente descritos, el glutamato produce el incremento en los niveles de algunas proteínas que son parte del reloj molecular (como PER1-2). En consecuencia se produce un retraso o adelanto en la fase del oscilador molecular de las células de los NSQ, que “pone en hora” al reloj circadiano.

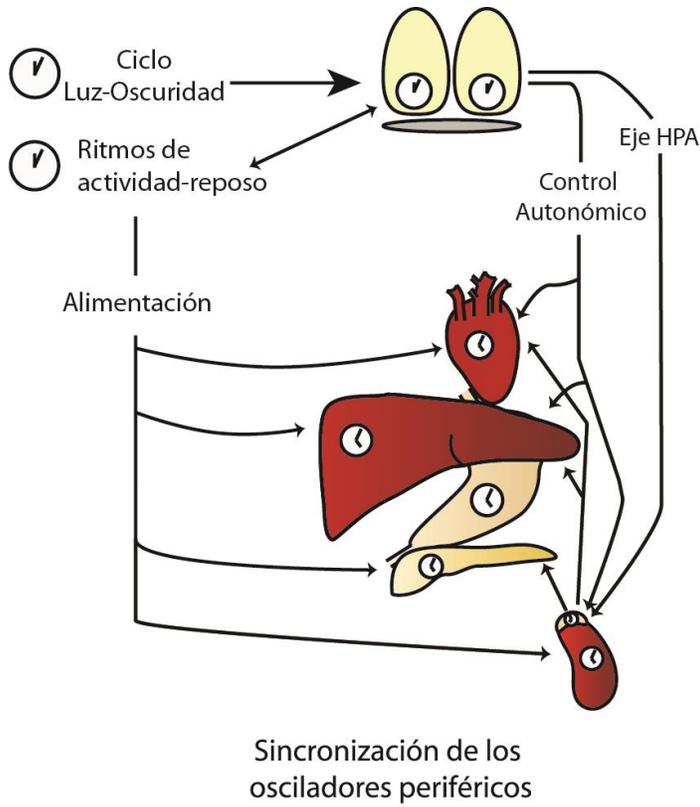
Más allá de su importancia como principal factor sincronizador, la luz no es el único estímulo al cual el reloj es capaz de sincronizarse. La sincronización a ciclos de temperatura, así como a estímulos sociales y a la disponibilidad de alimentos es de gran importancia y el sistema circadiano es capaz de integrar todas estas señales de modo de adaptar al organismo de la mejor manera posible.

### **1.1.9 El sistema circadiano de mamíferos: las vías de salida.**

La existencia de un reloj circadiano sólo puede evidenciarse (y resultar de relevancia para la fisiología de un organismo) si es capaz de controlar funciones y procesos de modo que los mismos ocurran de manera rítmica. Esto se logra mediante una variedad de mecanismos (muchos de ellos aún no descritos exhaustivamente) que permiten la comunicación de los NSQ con otras estructuras cerebrales y con la periferia.

Se han descrito vías neuronales y humorales de control de los NSQ sobre distintos ritmos biológicos. El ritmo de actividad locomotora, por ejemplo, parece estar controlado por señales humorales, ya que factores liberados por los NSQ como TGF- $\alpha$  (Factor de crecimiento transformante- $\alpha$ ) y PK2 (proquinecitina 2) son capaces de inhibir la actividad locomotora de animales, sin afectar el mecanismo de generación de los ritmos (Cheng et al. 2002; Kramer et al. 2001). Por otro lado, el control de los NSQ sobre los ritmos hormonales ocurre mediante su conexión con centros neuroendócrinos en el hipotálamo (los núcleos paraventriculares, NPV y el hipotálamo dorsomedial, HDM) y con centros autonómicos (simpáticos y parasimpáticos).

Más allá del estricto control por parte de los NSQ, la enorme mayoría de las células del cuerpo expresan los componentes del reloj molecular, y son capaces de mantener una expresión rítmica de los mismos. Esto les ha valido la denominación de *osciladores periféricos* (para diferenciarlos de los NSQ, considerados los osciladores centrales). Los osciladores presentes en diferentes órganos son capaces de sincronizarse a las señales enviadas por los NSQ, con distintas relaciones de fase entre sí. Así, los ritmos circadianos de ciertas funciones están determinados por el reloj propio de las células que ejercen esa función, y que es capaz de ajustarse a las señales provenientes de los NSQ y a otros sincronizadores como los alimentos (**Figura 1.1.12**).



**Figura 1.1.12.**

**Representación esquemática de la sincronización de osciladores periféricos.** Los NSQ se sincronizan al ciclo L:O, en una relación cercana con los ciclos de actividad-reposo. Los órganos periféricos reciben claves temporales de los NSQ a través del sistema nervioso autónomo o por vía endócrina. Además, la ingesta de alimentos funciona como un fuerte *zeitgeber* en los osciladores periféricos.

## **1.2 La comunicación inmune – circadiana.**

### **1.2.1 Neuroinmunología. Un campo emergente.**

Hace 25 años los neurocientíficos y los inmunólogos tenían muy pocos intereses científicos en común. Esto es, sin embargo, sorprendente, ya que la noción de que las infecciones con microorganismos patogénicos están acompañada por síntomas tales como anorexia, somnolencia y fatiga, es de conocimiento común para todos nosotros. De esta manera, no debiera sorprendernos el hecho de que el sistema inmune y el nervioso se comuniquen entre sí y afecten nuestra salud. Así, por ejemplo, existe evidencia de que enfermedades mentales tales como la depresión y la esquizofrenia están asociadas con anomalías en el sistema inmune.

En el **Anexo 2** se presenta un pequeño resumen acerca de los actores y mecanismos generales de la respuesta inmunológica. A continuación nos centraremos en lo que sucede a nivel del SNC.

### **1.2.2 La respuesta inmune en el SNC.**

La respuesta inflamatoria se ha asociado a un gran número de patologías cerebrales que incluyen enfermedades autoinmunes, injuria traumática, accidentes cerebrovasculares, enfermedades neurodegenerativas, e incluso esquizofrenia, epilepsia y autismo. Sin embargo, la respuesta inmune a nivel del SNC es especializada, y difiere considerablemente de lo que ocurre en la periferia. A pesar de que el SNC se encuentra relativamente recluido del sistema inmune periférico, posee su propia red de células que participan en la respuesta inmunológica, en la que las células gliales (principalmente microglía y astrocitos) se encargan de la defensa del SNC de injurias e infecciones montando procesos proinflamatorios. Estos procesos se encuentran altamente regulados y contrabalanceados por respuestas anti-inflamatorias y neuroprotectoras, ya que la activación glial excesiva resulta en daño neuronal crónico.

Más adelante daremos una descripción más exhaustiva acerca de las características y funciones de las células gliales en el SNC. En esta sección nos abocaremos a describir sus funciones en la respuesta inmune. Tal como mencionamos, los dos principales tipos de células gliales que median la respuesta inmune en el SNC son la microglía y los astrocitos:

- **Microglía:** este tipo celular representa entre un 5 a un 20% de las células gliales, dependiendo de la región cerebral. Estas células son quienes llevan principalmente a cabo las funciones fagocíticas en el SNC y proporcionan la primer línea de defensa del cerebro. Una vez activadas por señales proinflamatorias, estas células sufren un importante cambio morfológico, pasando de la forma normal ramificada a una forma activada, ameboide. Esto está acompañado por el incremento en la expresión de un gran número de receptores involucrados en la respuesta inmune. La microglía es capaz de secretar un gran número de citoquinas, e incluso factores del complemento. Finalmente, estas células tienen también la capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T, promoviendo el montaje de la respuesta adaptativa a nivel del SNC.
- **Astrocitos:** Las funciones de los astrocitos como efectores de la respuesta inmune innata son menos conocidas y apreciadas que para la microglía. Sin embargo, en el último tiempo, se han acumulado un gran número de evidencias que demuestran que estas células poseen una importante función en la regulación de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa. Los astrocitos expresan un gran número de receptores que reconocen moléculas o patrones asociados a patógenos, incluyendo los receptores tipo TLR. Una vez activados estos receptores, los astrocitos secretan una variedad de citoquinas, quimioquinas y neurotrofinas que son detectadas tanto por otras células gliales como por neuronas, contribuyendo a la propagación de la señal inflamatoria. Además, las citoquinas secretadas por los astrocitos promueven cambios en la Barrera Hemato-Encefálica (BHE, a la que los astrocitos rodean), lo que resulta en el reclutamiento de células inmunes periféricas. De esta manera, los astrocitos

amplifican tanto la respuesta inmune que se está desarrollando dentro del SNC, como la entrada de las células responsables de la respuesta adaptativa.

Resulta interesante que las células gliales son capaces no sólo de detectar patógenos invasores del SNC sino que también son sensibles a las respuestas inmunes que ocurren en la periferia, a través de citoquinas y quimioquinas que alertan al SNC mediante señales humorales y neuroquímicas. De esta manera, en condiciones de homeostasis, las proteínas inflamatorias sintetizadas en la periferia, así como aquellas sintetizadas a nivel central, juegan un papel importantísimo en el orquestado de las reacciones del SNC a factores de stress físicos o emocionales.

### **1.2.3 Las vías de señalización inmune desde la periferia al cerebro.**

El cerebro es capaz de monitorear las respuestas inmunes innatas a través de diversos mecanismos que actúan en paralelo (**Figura 1.2.1**).

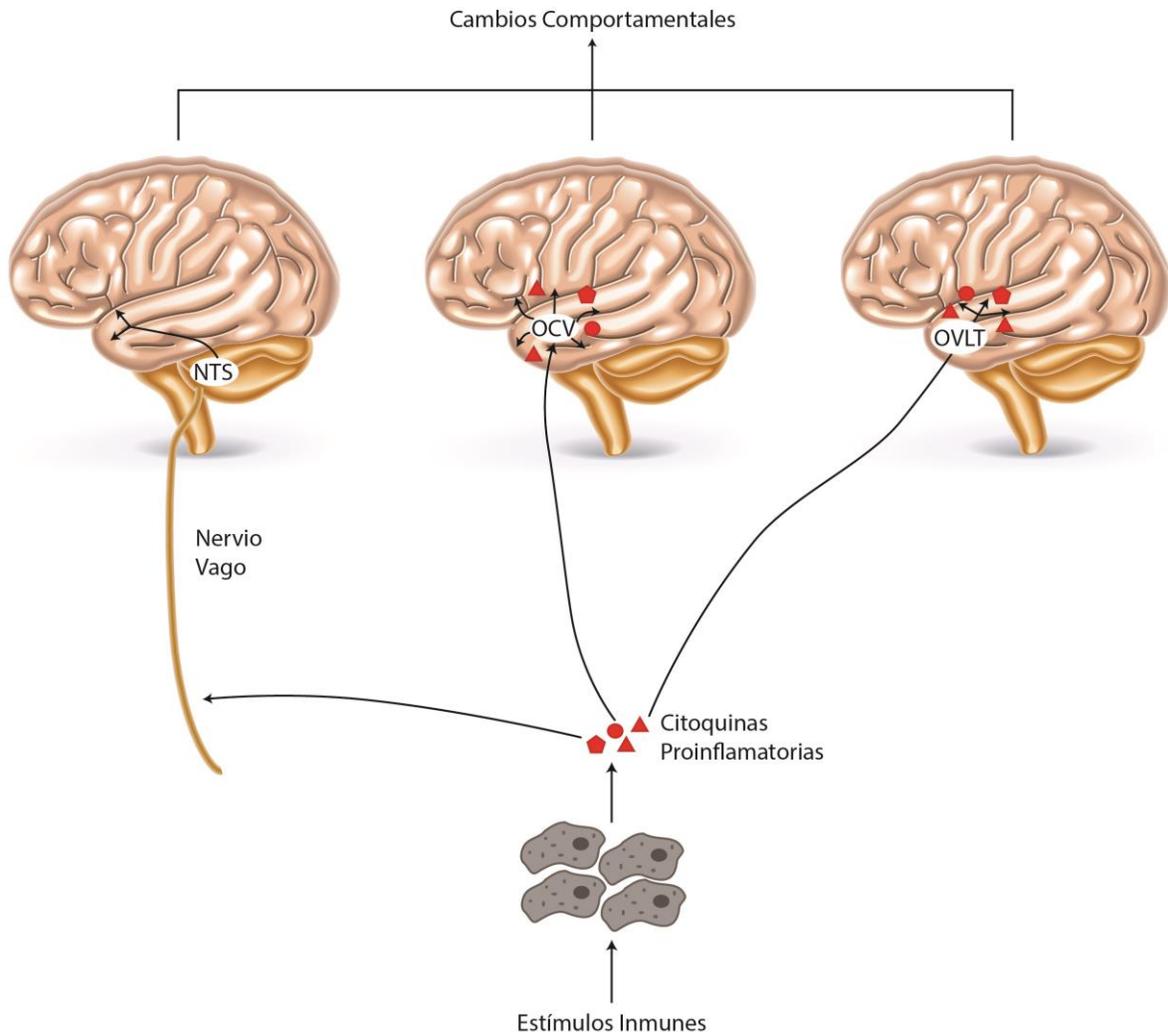
- Las citoquinas producidas localmente en la periferia durante una respuesta inflamatoria pueden activar vías neurales aferentes, tal es el caso de la activación del nervio vago durante infecciones abdominales, o la del nervio trigémino durante infecciones orales.
- En una segunda vía, humoral, las células similares a macrófagos, residentes en los órganos cícumventriculares y en el plexo coroideo, son capaces de reconocer patrones asociados a patógenos, que circulan. En respuesta a esto estas células se activan y secretan citoquinas que pueden entrar al cerebro.

- Las citoquinas circulantes pueden también ingresar al cerebro a través de regiones en las que la BHE es permeable, como el organum vasculosum de la lamina terminalis (OVLT).

Los mecanismos que median las consecuencias comportamentales de la acción de las citoquinas a nivel del SNC aún no se encuentran completamente caracterizadas. Las citoquinas cuyo rol se encuentra más estudiado, en lo que respecta a la inducción de *sickness behavior* (alteraciones comportamentales asociadas a un proceso infeccioso), son la Interleuquina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), y el Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). La activación del sistema inmune periférico, mediante la administración de un componente pared bacteriana (Lipopolisacarido, LPS), induce la expresión de IL-1 $\beta$  y de otras citoquinas en ciertas estructuras del cerebro (André et al. 2008; Turrin et al. 2001). Además, la administración sistémica o central de TNF- $\alpha$  o de IL-1 $\beta$  es capaz de inducir un amplio espectro de efectos comportamentales, asociados al *sickness behavior*, tales como descenso en la actividad locomotora, retraimiento social, reducción en la ingesta de comida, incrementos en la fase de sueño NREM, y problemas cognitivos (McCusker & Kelley 2013).

Por otro lado, las citoquinas antiinflamatorias son capaces de regular la duración e intensidad del *sickness behavior*, probablemente inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias, y atenuando las cascadas de señalización activadas por las mismas. Así, por ejemplo, los síntomas de *sickness behavior* se encuentran exagerados en ratones deficientes para la citoquina IL-10, y esto se encuentra asociado a una mayor inducción de citoquinas proinflamatorias en el SNC de estos animales (Richwine et al. 2009).

## INTRODUCCIÓN GENERAL



**Figura 1.2.1. Vías de comunicación entre el sistema inmune periférico y el SNC.** La activación inmune periférica puede desencadenar cambios comportamentales mediante la señalización al SNC. La misma puede realizarse mediante la activación de las células de los órganos circumventriculares (OVC, panel izquierdo), mediante la activación de aferencias nerviosas como el nervio vago (panel central), o por el traspaso directo a través de regiones sin BHE (OVL: organum vasculosum de la lamina terminalis).

#### **1.2.4 Comunicación bidireccional entre el sistema circadiano y el sistema inmune.**

Tal como hemos mencionado, el SNC y el sistema inmune se encuentran en un diálogo continuo, y las interacciones entre ambos sistemas son de tal importancia que hoy en día es difícil estudiar un trastorno neurológico que no involucre alteraciones de parámetros inmunes. El sistema circadiano resulta un modelo de gran interés a la hora de estudiar estas interacciones, ya que, como dijimos antes, el control sobre variables comportamentales y fisiológicas se encuentra localizado en una estructura cerebral definida y altamente caracterizada. Veremos ahora que el sistema inmune no escapa al control del sistema circadiano y que, a la inversa, la activación de señales proinflamatorias es capaz de alterar el reloj biológico.

##### **1.2.4.1 Control circadiano del sistema inmune.**

El reloj biológico ejerce un control preciso sobre el sistema inmune. Los niveles de citoquinas circulantes, células inmunes y hormonas que regulan la respuesta inmune varían a lo largo del día (**Figura 1.2.2**). Asimismo, se ha descrito la oscilación de genes reloj, de receptores relacionados con la respuesta inmune y de moléculas señalizadoras de esta vía en órganos y células involucrados en la respuesta inmunológica (**Figura 1.2.2**).

Se han observado variaciones circadianas importantes en la respuesta a diversos estímulos que activan el sistema inmunológico. La primera descripción fue realizada en el año 1960 por Franz Halberg y colaboradores, quienes observaron una variación diaria en la susceptibilidad de ratones a dosis altas de LPS, con una mayor mortalidad durante el día. Posteriormente, Hrushesky y colaboradores realizaron un experimento análogo administrando TNF- $\alpha$ , obteniendo similares resultados en la distribución de los porcentajes de mortalidad en distintos horarios (Hrushesky et al. 1994). Trabajos posteriores determinaron que las administraciones de LPS en dosis altas durante el día, causan una mayor

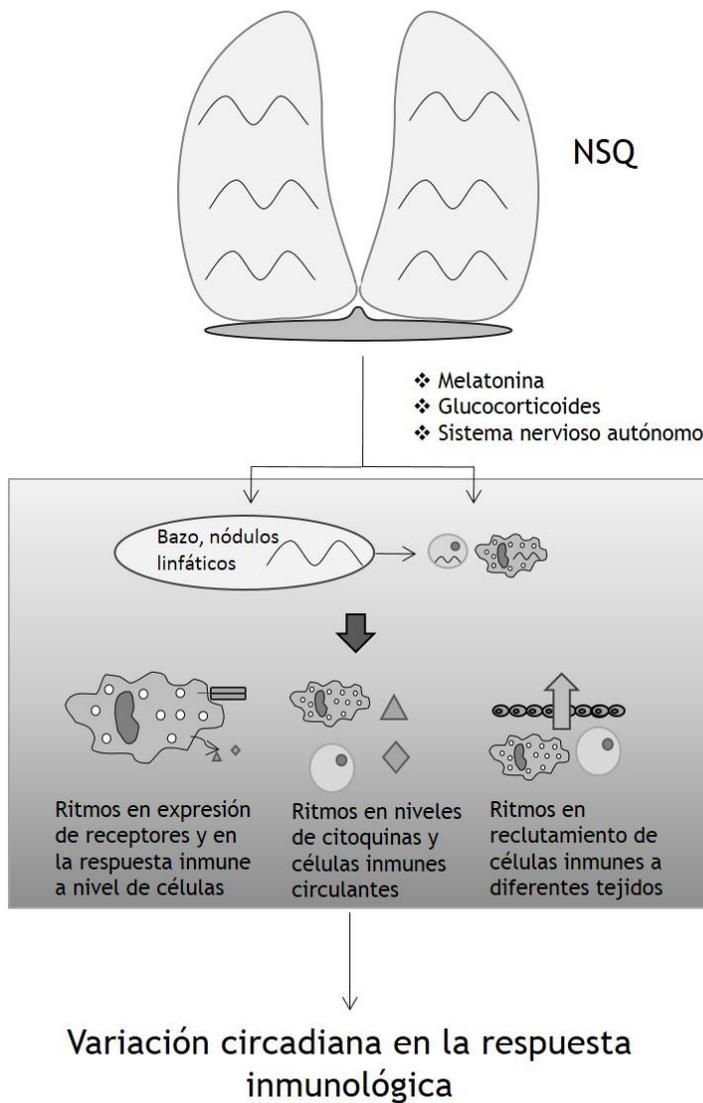
## INTRODUCCIÓN GENERAL

inducción de citoquinas proinflamatorias circulantes, lo que podría colaborar al incremento de la mortalidad en esa fase (Marpegan et al. 2009). Además, esta variación circadiana en la mortalidad por shock séptico depende de la capacidad de migración de leucocitos, la cual está fuertemente controlada por el reloj (Scheiermann et al. 2012). La respuesta a LPS se encuentra modulada por el reloj, no sólo a nivel del organismo, sino también a nivel tipo celular-específico. Por ejemplo, los macrófagos peritoneales muestran un grado de activación en respuesta a LPS que está modulado circadianamente e, incluso, estos ritmos no dependen de las señales de los NSQ, sino que estarían gobernados (al menos en el modelo estudiado) por el reloj propio de los macrófagos (Keller et al. 2009). Los hallazgos en cuanto a la variación en la respuesta a LPS se han extendido a modelos de infección. Así, por ejemplo, animales infectados con *Salmonella entérica* poseen una mayor capacidad de luchar y deshacerse de las bacterias si la infección inicial se produjo durante la noche (Bellet et al. 2013), y esta variación de debe, en parte, a la variación circadiana en la producción de péptidos antimicrobianos, que afecta a la microbiota residente, y, cuando la misma está suprimida, se favorece la infección. En otro trabajo se estudió la variación en la mortalidad debida a la infección con *Listeria monocytogenes*, encontrándose una menor sobrevivencia cuando los ratones son infectados hacia la mitad del día (Nguyen et al. 2013). Las variaciones circadianas en el funcionamiento inmunológico se extienden también a la inmunidad adaptativa. Se ha descrito que la proliferación de las células T luego de la estimulación de sus receptores sigue un ritmo de 24 horas, lo que ha llevado a pensar en posibles estrategias para incrementar la eficiencia de las vacunaciones (Fortier et al. 2011).

De esta manera, las variaciones en los niveles de quimioattractantes (quimioquinas), en los patrones de tráfico leucocitario, en los niveles de citoquinas circulantes y en la habilidad fagocítica en horarios que se acercan al comienzo de la fase de actividad pueden ser interpretados como un indicativo de que el sistema inmune se encuentra más sensible, y en mayor estado de inmunovigilancia, lo que anticiparía al momento en el que el riesgo de infección es mayor. En este sentido, alteraciones en el reloj o en la sincronización del mismo a los ciclos externos,

afectan negativamente el funcionamiento del sistema inmune. Bajo condiciones de oscuridad constante (Marpegan et al. 2009) o en protocolos de desincronización del ciclo circadiano al patrón de L:O (por ejemplo, en un modelo de Jet lag crónico, Castanon-Cervantes et al. 2010), un desafío con LPS lleva a una respuesta inmune más severa y a una mayor mortalidad de los animales.

Las vías precisas a través de las cuales el sistema circadiano regula las variables inmunológicas no se conocen aún en profundidad, aunque hay evidencias que sugieren mecanismos neurales y endocrinos entre los dos sistemas (**Figura 1.2.2**). El control circadiano mediante vías neurales podría ser ejercido a través de neuronas de los Núcleos Paraventriculares del Hipotálamo (NPV). Los NPV forman parte del circuito de salida de los NSQ, y son capaces de controlar *inputs* autonómicos a estructuras periféricas del sistema inmune, tales como el timo, el bazo y los nódulos linfáticos. De hecho, señales simpáticas, mediadas por norepinefrina, que llegan al bazo controlan los ritmos en los niveles de citoquinas y factores citolíticos en células del bazo y en células NK (Logan et al. 2011). Además, el control circadiano sobre el sistema nervioso autónomo es responsable de los cambios temporales en la localización de diferentes células inmunes. Así, por ejemplo, se ha descrito que la epinefrina controla los ritmos en los niveles de células T CD8+ circulantes (Dimitrov et al. 2009). Además, los ritmos en el reclutamiento de leucocitos a distintos tejidos se encuentra gobernado por inervaciones simpáticas locales que actúan sobre receptores adrenérgicos (Scheiermann et al. 2012). En cuanto al control mediante parámetros endócrinos, se ha descrito un fuerte control circadiano sobre la melatonina (una hormona secretada por la glándula pineal) y sobre los glucocorticoides, siendo que ambos poseen funciones inmunomodulatorias. La administración de melatonina es capaz de modular los niveles de TNF- $\alpha$  circulantes, así como también de controlar la expresión de citoquinas y de genes reloj en el timo (Naidu et al. 2010). Asimismo, el cortisol es capaz de controlar los niveles de células T circulantes (Dimitrov et al. 2009).



**Figura 1.2.2 Control circadiano de la respuesta inmune.** Los NSQ controlan la respuesta rítmica del sistema inmune a través de vías endocrinas y neurales. Su acción puede darse, por ejemplo, sincronizando el reloj molecular presente en tejidos y células inmunes. Como consecuencia, se observan ritmos en los niveles de citoquinas circulantes así como en el número, tráfico y capacidad de respuesta de las células del sistema inmune lo que lleva a variaciones en la respuesta a estímulos proinflamatorios o a patógenos.

#### 1.2.4.2 Señalización desde el sistema inmune al reloj biológico. *The immune system strikes back.*

En la sección anterior describimos cómo existe un control circadiano sobre variables inmunes. Ahora bien, para que la interacción entre dos sistemas ocurra de forma dinámica, los mismos deben ser capaces de modificarse mutuamente, lo que implica la existencia de un mecanismo de retroalimentación capaz de ajustar el reloj circadiano frente a distintos desafíos inmunes.

Los efectos que puede tener la activación del sistema inmune sobre los ritmos circadianos puede evidenciarse en ciertas patologías, que poseen un componente inflamatorio, y que alteran los ritmos circadianos, tales como la Tripanosomiasis humana del África, el cáncer, y la enfermedad de Alzheimer (revisado en: Duhart et al. 2013). Más allá de estas patologías, los efectos de la activación inmune se han estudiado en modelos más simplificados, particularmente mediante la administración de moléculas de acción proinflamatoria, sea directamente a nivel central, o en la periferia:

### Interferones (IFN $\alpha$ y $\gamma$ ).

Una de las primeras evidencias del efecto de las citoquinas sobre los NSQ fue el descubrimiento de la presencia de receptores de IFN- $\gamma$  en los NSQ, donde se describió además un ritmo diario en su expresión (Lundkvist et al. 1998). Posteriormente se demostró que el tratamiento de cultivos de neuronas de los NSQ con IFN- $\gamma$  es capaz de alterar los ritmos de actividad eléctrica y también los ritmos de expresión de Per1-luc, actuando, en este último caso, tanto a nivel poblacional como en células individuales (Kwak et al. 2008).

En cuanto al IFN- $\alpha$ , se ha reportado que dosis diarias de esta citoquina durante varios días, son capaces de disminuir la amplitud de los ritmos de expresión de genes reloj (tanto en los NSQ como en el hígado), así como los ritmos de actividad locomotora y temperatura y la respuesta del reloj a la luz. Los efectos de estas aplicaciones, varían a su vez según el momento del día en el que se aplique la citoquina, dando cuenta de la relación bidireccional entre el sistema inmune y el circadiano (Koyanagi & Ohdo 2002; Ohdo et al. 2001; Shinohara et al. 2008).

### Interleuquina 1- $\beta$ .

Se ha descrito la oscilación del receptor y de la citoquina en los NSQ (Beynon & Coogan 2010) y del ARNm del receptor en la región hipotalámica (Taishi et al. 1997). Además, en un modelo de activación inmune periférica (administración de LPS periférico, ver más adelante), los niveles del receptor de IL-1 se incrementan

en los NSQ de los animales tratados, aunque no se observó el mismo efecto para la citoquina (Beynon & Coogan 2010).

La administración central de IL-1 $\beta$  es capaz de provocar retrasos en la fase de los ritmos de actividad locomotora, lo que indica que el oscilador central es sensible a esta citoquina (Leone et al. 2012). En cuanto a la expresión de genes reloj, se ha descrito que la IL-1 $\beta$  es capaz de disminuir la expresión de Per3 y Dbp en fibroblastos de ratón (Cavadini et al. 2007).

Los ritmos diarios de temperatura, actividad y frecuencia cardíaca han sido evaluados en ratones doble knock out para IL-1 $\alpha$  e IL- $\beta$ . Los mutantes no mostraron grandes diferencias con respecto a los animales control en situaciones normales, aunque se observaron diferencias significativas en los ritmos, e incluso patrones ultradianos, en los mutantes durante el proceso de recuperación de una cirugía, mientras que el grupo control no mostró estos efectos (Furuzawa et al. 2002).

#### Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

La expresión de TNF- $\alpha$  se ha documentado en distintas regiones del cerebro, e incluso con variaciones diarias en los niveles de ARN (Floyd & Krueger 1997). Particularmente a nivel de los NSQ se han descrito oscilaciones a nivel de los mensajeros del receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), con un máximo durante la noche temprana (Paladino et al. 2014).

La administración central de TNF- $\alpha$  es capaz de inducir cambios de fase en los ritmos de actividad locomotora en ratones y, como veremos más adelante, esta citoquina participa en la vía que lleva a los cambios de fase mediados por la activación inmune periférica (Leone et al. 2012). En estudios *in vitro* se ha encontrado que las neuronas de los NSQ modifican sus patrones de actividad eléctrica en respuesta a TNF- $\alpha$ , siendo este efecto mediado por el óxido nítrico (Nygård et al. 2009). En cuanto a los efectos sobre los genes reloj, se ha encontrado que el tratamiento de fibroblastos con TNF- $\alpha$  lleva primero a una inducción de Per1 y Per2, a tiempos cortos (1 hora), seguido de una disminución en

la amplitud de los ritmos de estos y otros genes. Estos efectos están mediados por la vía de p38 y MAPK, y dependen del receptor TNFR1 (Cavadini et al. 2007; Petrzilka et al. 2009). Además, el tratamiento crónico con TNF- $\alpha$  lleva a una disminución de la amplitud de expresión de genes reloj en el hígado in vivo, y a una inhibición transitoria de los ritmos de actividad locomotora (Cavadini et al. 2007).

Finalmente, el análisis de los ritmos de actividad locomotora en animales knock out para el receptor TNFR1 mostró que estos animales poseen un período levemente superior a la cepa salvaje, pero no difieren en su capacidad de sincronizarse a cambios en el ciclo de L:O (pero sí a LPS, como veremos más adelante; Paladino et al. 2014).

#### Cócteles proinflamatorios.

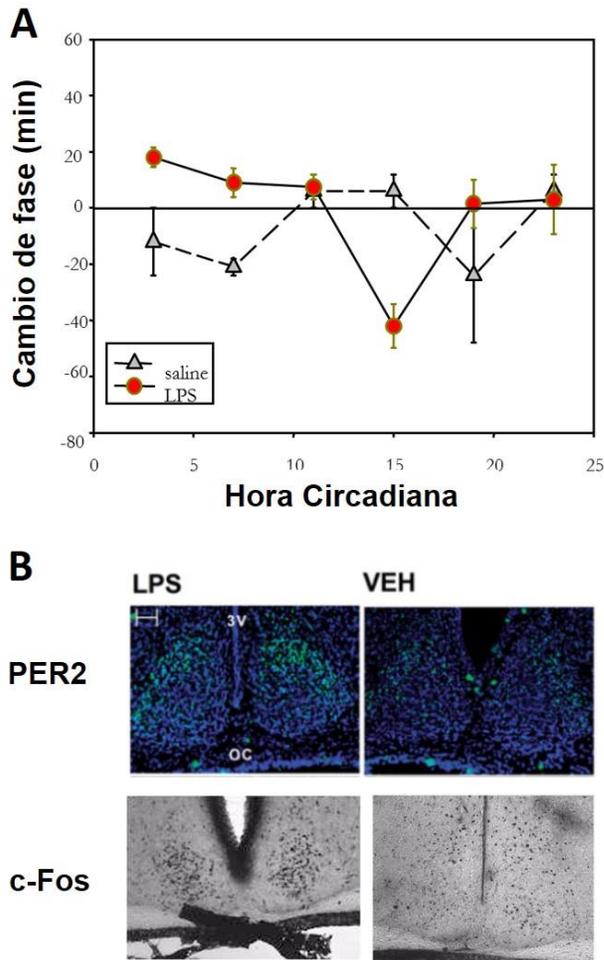
En diversos trabajos se han analizado los efectos de cócteles conteniendo una combinación de agentes proinflamatorios sobre el sistema circadiano. Estos estudios buscan analizar la respuesta del reloj a una combinación de citoquinas que se conoce que se inducen en patologías particulares. Así, por ejemplo, un cóctel conteniendo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y LPS es capaz de disminuir la frecuencia de disparos excitatorios y de disminuir la amplitud en los ritmos de actividad eléctrica en neuronas de los NSQ (Lundkvist et al. 2002; Kwak et al. 2008). Por otro lado, la administración central de un cóctel conteniendo IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  es capaz de inducir la expresión de la proteína cFos (un marcador de la activación neuronal) en los NSQ (Sadki et al. 2007).

#### **1.2.5 Un modelo de estudio para la interacción inmune-circadiana: la administración de LPS intraperitoneal.**

Como se describió en la sección anterior, las citoquinas modifican al sistema circadiano de diversas maneras. En muchos trabajos antes mencionados se analizan los efectos de las citoquinas o las variaciones de sus receptores en condiciones de L:O. Si bien estos es suficiente para describir ritmos diarios, no es

suficiente para hablar de ritmos circadianos endógenos ya que los efectos vistos podrían no estar mediados por un oscilador y aun así responder al ciclo L:O. Asimismo, el efecto de las citoquinas sobre los ritmos de actividad locomotora podría estar siendo “opacado” por la presencia de un sincronizador más fuerte para el sistema circadiano, como seguramente lo es el ciclo L:O.

En nuestro laboratorio utilizamos como modelo de los efectos de la activación inmune sobre el sistema circadiano a la administración de una dosis baja (25 -100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) de LPS en forma intraperitoneal (que no modifica la temperatura corporal de los animales). Al realizar este estímulo en ratones mantenidos en oscuridad constante se encontró que existe una curva de respuesta de fase para el LPS, produciéndose retrasos en la fase de actividad locomotora en rueda sólo cuando el LPS se administra durante la noche subjetiva temprana, a CT 15 (**Figura 1.2.3**; Marpegán et al. 2005). Este tratamiento también es capaz de inducir la activación de las neuronas de los NSQ (evidenciada por la expresión de cFos), así como también la expresión de PER2 (**Figura 1.2.3**; Paladino et al. 2014).



**Figura 1.2.3 Efectos del LPS intraperitoneal sobre el reloj circadiano. A)** La administración de LPS intraperitoneal produce retrasos en la fase de los ritmos de actividad locomotora en ratones, sólo cuando se lo administra a CT 15. Marpegán et al 2005 **B)** La administración de LPS ip lleva a la activación de los NSQ, produciendo la inducción de c-Fos y de PER2. Paladino et al 2010 y 2014.

Es sabido que el LPS periférico induce una respuesta inmune que involucra el incremento de diversas citoquinas y quimioquinas tanto a nivel periférico como central. Analizando las posibles rutas de acción del LPS sobre el sistema circadiano, hemos encontrado que el estímulo es dependiente de los receptores TLR-4 (el receptor más común para LPS), ya que animales mutantes de los mismos no muestran cambios de fase ante el LPS (Paladino et al. 2010). En cuanto a las citoquinas involucradas en esta respuesta (y a su lugar de acción), al analizar los niveles de diversas citoquinas circulantes luego de la administración de LPS, encontramos que, si bien había un aumento significativo de algunos de ellos (incluyendo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6), no hubo diferencias en la inducción entre administraciones realizadas en el momento en el que el reloj es sensible al LPS, y

una fase opuesta (Leone et al. 2012). Esto sugirió que si bien el aumento de las citoquinas circulantes puede ser necesario, no sería suficiente para provocar un cambio en la fase del reloj. Al analizar el rol de las citoquinas a nivel central, se encontró que un bloqueo de la acción de TNF- $\alpha$ , pero no de IL-1 $\beta$ , es capaz de suprimir la respuesta del reloj biológico al estímulo periférico con LPS (Leone et al. 2012). En concordancia con el rol de TNF- $\alpha$ , los efectos en la fase, y en la expresión de genes reloj en los NSQ, producidos por el LPS periférico, desaparecen en animales *knock out* para TNFR1 (Paladino et al. 2014).

Como hemos visto, el sistema circadiano es sensible a la activación inmune periférica, y su respuesta está mediada por TNF- $\alpha$  actuando a nivel de los NSQ. Ahora bien, cabe preguntarse cuáles son las células que, en los NSQ, responden al TNF- $\alpha$ , y median los efectos del mismo sobre el reloj biológico. De esta manera, en el Capítulo 1 analizaremos el rol de las células gliales (particularmente astrocitos), en la modulación del reloj circadiano por TNF- $\alpha$ . Además, más allá del ya descrito rol de esta citoquina proinflamatoria, resulta interesante estudiar qué otras moléculas, actuando a nivel de los NSQ, están involucradas en la respuesta del reloj a los estímulos inmunes. Por esto, en el Capítulo 2, nos abocamos al estudio del rol de la quimioquina CCL2 en la activación del reloj biológico por el sistema inmune. Finalmente, dado que la activación del sistema inmune mediante dosis bajas de LPS es un fenómeno transitorio, nos propusimos estudiar un modelo de alteración inmune sostenida en el tiempo. Para ello en el Capítulo 3 se analizaron los efectos de tumores primarios hipotalámicos (que alteran diversas vías inmunes localmente) en los ritmos de actividad locomotora, y en el Anexo 1 se estudiaron los ritmos circadianos en ratones inmunosuprimidos.

**Bibliografía de la Introducción General.**

- Abrahamson, E.E. & Moore, R.Y., 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain research*, 916(1-2), pp.172–91.
- André, C. et al., 2008. Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. *Journal of neuroimmunology*, 200(1-2), pp.90–9.
- Bellet, M.M. et al., 2013. Circadian clock regulates the host response to *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), pp.9897–902.
- Beynon, A.L. & Coogan, A.N., 2010. Diurnal, age, and immune regulation of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 type 1 receptor in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Chronobiology international*, 27(8), pp.1546–63.
- Castanon-Cervantes, O. et al., 2010. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(10), pp.5796–805.
- Cavadini, G. et al., 2007. TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), pp.12843–8.
- Cheng, M.Y. et al., 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417(6887), pp.405–10.
- Dimitrov, S. et al., 2009. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Cell*, 113(21), pp.5134–5143.
- Drucker-Colín, R. et al., 1984. Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain research*, 311(2), pp.353–7.
- Duhart, J.M. et al., 2013. Role of Astrocytes in the Immune-Circadian Signaling. *Advances in Neuroimmune Biology*, 4(2), pp.85–96.
- Floyd, R.A. & Krueger, J.M., 1997. Diurnal variation of TNF alpha in the rat brain. *Neuroreport*, 8(4), pp.915–8.
- Fortier, E.E. et al., 2011. Circadian variation of the response of T cells to antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(12), pp.6291–300.

- Furuzawa, M. et al., 2002. Diurnal variation of heart rate, locomotor activity, and body temperature in interleukin-1 alpha/beta doubly deficient mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 51(1), pp.49–56.
- Hrushesky, W.J. et al., 1994. Circadian dynamics of tumor necrosis factor alpha (cachectin) lethality. *The Journal of experimental medicine*, 180(3), pp.1059–65.
- Inouye, S.T. & Kawamura, H., 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11), pp.5962–6.
- Keller, M. et al., 2009. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), pp.21407–12.
- Konopka, R.J. & Benzer, S., 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9), pp.2112–6.
- Koyanagi, S. & Ohdo, S., 2002. Alteration of intrinsic biological rhythms during interferon treatment and its possible mechanism. *Molecular pharmacology*, 62(6), pp.1393–9.
- Kramer, a et al., 2001. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5551), pp.2511–5.
- Kwak, Y. et al., 2008. Interferon- $\gamma$  Alters Electrical Activity and Clock Gene Expression in Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *Journal of Biological Rhythms*, (2), pp.150–159.
- Leise, T.L., 2013. Wavelet analysis of circadian and ultradian behavioral rhythms. *Journal of circadian rhythms*, 11(1), p.5.
- Leone, M.J. et al., 2012. Role of proinflammatory cytokines on lipopolysaccharide-induced phase shifts in locomotor activity circadian rhythm. *Chronobiology international*, 29(6), pp.715–23.
- Logan, R.W., Arjona, A. & Sarkar, D.K., 2011. Role of sympathetic nervous system in the entrainment of circadian natural-killer cell function. *Brain, behavior, and immunity*, 25(1), pp.101–9.

- Lowrey, P.L. & Takahashi, J.S., 2011. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. *Advances in genetics*, 74, pp.175–230.
- Lundkvist, G.B. et al., 1998. Expression of an oscillating interferon-gamma receptor in the suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport*, 9(6), pp.1059–63.
- Lundkvist, G.B., Hill, R.H. & Kristensson, K., 2002. Disruption of Circadian Rhythms in Synaptic Activity of the Suprachiasmatic Nuclei by African Trypanosomes and Cytokines. *Neurobiology of Disease*, 11(1), pp.20–27.
- Marpegan, L. et al., 2009. Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: correlation with proinflammatory factors. *Chronobiology international*, 26(7), pp.1430–42.
- Marpegán, L. et al., 2005. Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *Journal of neuroimmunology*, 160(1-2), pp.102–9.
- McCusker, R.H. & Kelley, K.W., 2013. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. *The Journal of experimental biology*, 216(Pt 1), pp.84–98.
- Moore, R.Y. & Lenn, N.J., 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 146(1), pp.1–14.
- Naidu, K.S., Morgan, L.W. & Bailey, M.J., 2010. Inflammation in the avian spleen: timing is everything. *BMC molecular biology*, 11(1), p.104.
- Nguyen, K.D. et al., 2013. Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6153), pp.1483–8.
- Nygård, M. et al., 2009. Rapid nitric oxide-dependent effects of tumor necrosis factor-alpha on suprachiasmatic nuclei neuronal activity. *Neuroreport*, 20(2), pp.213–7.
- Ohdo, S. et al., 2001. Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nature medicine*, 7(3), pp.356–60.
- Orozco-Solis, R. & Sassone-Corsi, P., 2014. Epigenetic control and the circadian clock: linking metabolism to neuronal responses. *Neuroscience*, 264, pp.76–87.
- Paladino, N. et al., 2014. Modulation of mammalian circadian rhythms by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Chronobiology international*, 31(5), pp.668–79.

- Paladino, N. et al., 2010. Paying the circadian toll: the circadian response to LPS injection is dependent on the Toll-like receptor 4. *Journal of neuroimmunology*, 225(1-2), pp.62–7.
- Petrzilka, S. et al., 2009. Clock gene modulation by TNF-alpha depends on calcium and p38 MAP kinase signaling. *Journal of biological rhythms*, 24(4), pp.283–94.
- Ralph, M.R. et al., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4945), pp.975–8.
- Refinetti, R., Lissen, G.C. & Halberg, F., 2007. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biological rhythm research*, 38(4), pp.275–325.
- Richwine, A.F. et al., 2009. Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain, behavior, and immunity*, 23(6), pp.794–802.
- Robinson, I. & Reddy, a B., 2014. Molecular Mechanisms of the Circadian Clockwork in Mammals. *FEBS letters*, (June), pp.1–7.
- Sadki, A. et al., 2007. Suppressors, receptors and effects of cytokines on the aging mouse biological clock. *Neurobiology of aging*, 28(2), pp.296–305.
- Scheiermann, C. et al., 2012. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity*, 37(2), pp.290–301.
- Shinohara, A. et al., 2008. Dosing schedule-dependent change in the disruptive effects of interferon-alpha on the circadian clock function. *Life sciences*, 83(15-16), pp.574–80.
- Stephan, F.K. & Zucker, I., 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), pp.1583–6.
- Taishi, P. et al., 1997. Diurnal variations of interleukin-1 beta mRNA and beta-actin mRNA in rat brain. *Journal of neuroimmunology*, 75(1-2), pp.69–74.
- Turrin, N.P. et al., 2001. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain research bulletin*, 54(4), pp.443–53.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S. & Kay, S. a, 2010. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual review of physiology*, 72, pp.551–77.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Yoo, S.-H. et al., 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), pp.5339–46.

# Hipótesis y Objetivo General



### **Hipótesis y Objetivo General.**

En la introducción general se ha descrito cómo el sistema circadiano es sensible a la activación inmune periférica. Las células gliales son las responsables de montar la respuesta inmune a nivel del SNC, a través de la liberación de citoquinas y quimioquinas. A pesar de esto, se desconocen aún los actores celulares y moleculares que median la respuesta del reloj a la activación inmune periférica y tampoco se han descrito los efectos de alteraciones inmunes duraderas sobre el reloj biológico. Considerando la evidencia mencionada, proponemos como Hipótesis General de esta Tesis:

***La alteración inmune es capaz de modular al reloj circadiano, tanto en modelos de activación periférica, como en alteraciones prolongadas.***

Como consecuencia, se desprende el objetivo general de la tesis:

***Estudiar los efectos y mecanismos de las alteraciones de variables inmunológicas sobre el reloj circadiano de ratón.***

En el Capítulo 1 de esta tesis profundizaremos el conocimiento acerca de los efectos del TNF- $\alpha$  sobre el reloj, con énfasis en el rol de los astrocitos en la respuesta a esa citoquina. Luego, en el Capítulo 2 introduciremos una nueva molécula responsable en la señalización entre el sistema inmune y el reloj central, la quimioquina CCL2, y estudiaremos su rol en la respuesta del reloj circadiano de astrocitos a estímulos inmunes. Finalmente en el Capítulo 3, describiremos los efectos de un modelo de alteración inmune en el SNC, los gliomas hipotalámicos, sobre el reloj biológico.



# Capítulo 1

“Los astrocitos en la interacción  
inmune-circadiana”



## **2.1 Introducción.**

Tal como hemos descripto, en los últimos 25 años se ha profundizado el estudio de las alteraciones en el SNC en respuesta a estímulos inmunológicos. En particular, el sistema circadiano y el inmunológico interactúan de forma bidireccional. Hay una gran variedad de funciones inmunes que se encuentran bajo control circadiano (Scheiermann et al. 2013), y su importancia se ve reflejada en diversos modelos de alteración circadiana que llevan a alteraciones en la respuesta inmunológica. A su vez, diversos factores inmunológicos son capaces de modular el sistema circadiano, actuando tanto a nivel central como periférico. Como ya mencionamos, se ha descripto la presencia de receptores para citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en los NSQ (Paladino et al. 2014; Beynon & Coogan 2010), siendo estas moléculas capaces de producir cambios de fase cuando se administran sobre esa región del cerebro (Leone et al. 2012).

A pesar de que existen diversos trabajos que resaltan la modulación de los NSQ por parte de efectores inmunes, poco se sabe respecto a qué tipos celulares son relevantes en este proceso. Las células gliales, particularmente los astrocitos, aparecen como buenos candidatos para mediar las interacciones inmune-circadianas ya que estas células son capaces de reconocer y responder a una gran variedad de estímulos inmunes. Además, en los últimos años se han descripto una gran variedad de procesos neuronales y de variables fisiológicas que están regulados por estas células. Tal como veremos, los ritmos circadianos no parecen ser la excepción, resultando de interés el estudio de los efectos de la activación inmune sobre el reloj circadiano de los astrocitos así como las consecuencias de la misma sobre los ritmos en los NSQ y sus salidas comportamentales.

### **2.1.1 ¿Qué hay en la carta?: Tipos de células gliales...para todos los gustos.**

El sistema nervioso central se encuentra compuesto principalmente por dos grandes tipos celulares: las neuronas y las células gliales. Estas últimas presentan una gran variedad morfológica y funcional, dividiéndose a su vez en microglía, las cuales durante

el desarrollo derivan de precursores eritromieloides, y microglía, que deriva de células madres neuroepiteliales e incluye astrocitos, células empendimales, oligodendrocitos y células NG2. Las diferencias no radican sólo en su origen o morfología, sino que, como veremos, cada tipo de célula glial cumple funciones altamente especializadas y variadas (**Figura 2.1.1**).

### Astrocitos.

Son células que se caracterizan por poseer extremos que contactan una lámina basal alrededor de los vasos sanguíneos y/o la pia madre, o el humor vítreo en el ojo. Existen algunas proteínas que son distintivas de estas células, siendo la más importante la proteína fibrilar glial (GFAP) que es expresada en el citoesqueleto de los astrocitos. Los astrocitos son el tipo celular glial más abundante del SNC. Poseen numerosas proyecciones que acoplan a las neuronas con el suministro de nutrientes proveniente de la sangre (Reichenbach & Wolburg 2004). Son también responsables del mantenimiento del entorno iónico de las neuronas, así como de la “limpieza” de neurotransmisores acumulados en la sinapsis. Además, son parte de la BHE, y, como se describió en la introducción general, cumplen funciones inmunes en el SNC (Farina et al. 2007). Como veremos más adelante, estas células son además capaces de regular activamente la comunicación y plasticidad sináptica.

### Microglía

Se las considera como macrófagos residentes del SNC, con lo cual son los principales actores de la respuesta inmune. Constituyen alrededor del 10-15% del total de las células gliales. La microglía realiza un patrullaje constante del SNC, buscando agentes infecciosos y neuronas dañadas. Las células microgliales son extremadamente plásticas, y sufren profundos cambios estructurales dependiendo del rol que le toque suplir en un momento determinado (Ransohoff & Perry 2009). Como ya describimos, al activarse, en respuesta a un trauma o infección, estas células pasan de una forma ramificada (adaptada al rastillaje del SNC), a una ameboide, adquiriendo además la capacidad fagocítica y de secreción de citoquinas y quimioquinas. Estas células poseen además una función importantísima, tanto durante el desarrollo, como durante la adultez, en

términos del esculpido sináptico, es decir, de determinar qué sinapsis permanecen y cuales deben desaparecer (Kettenmann et al. 2011).

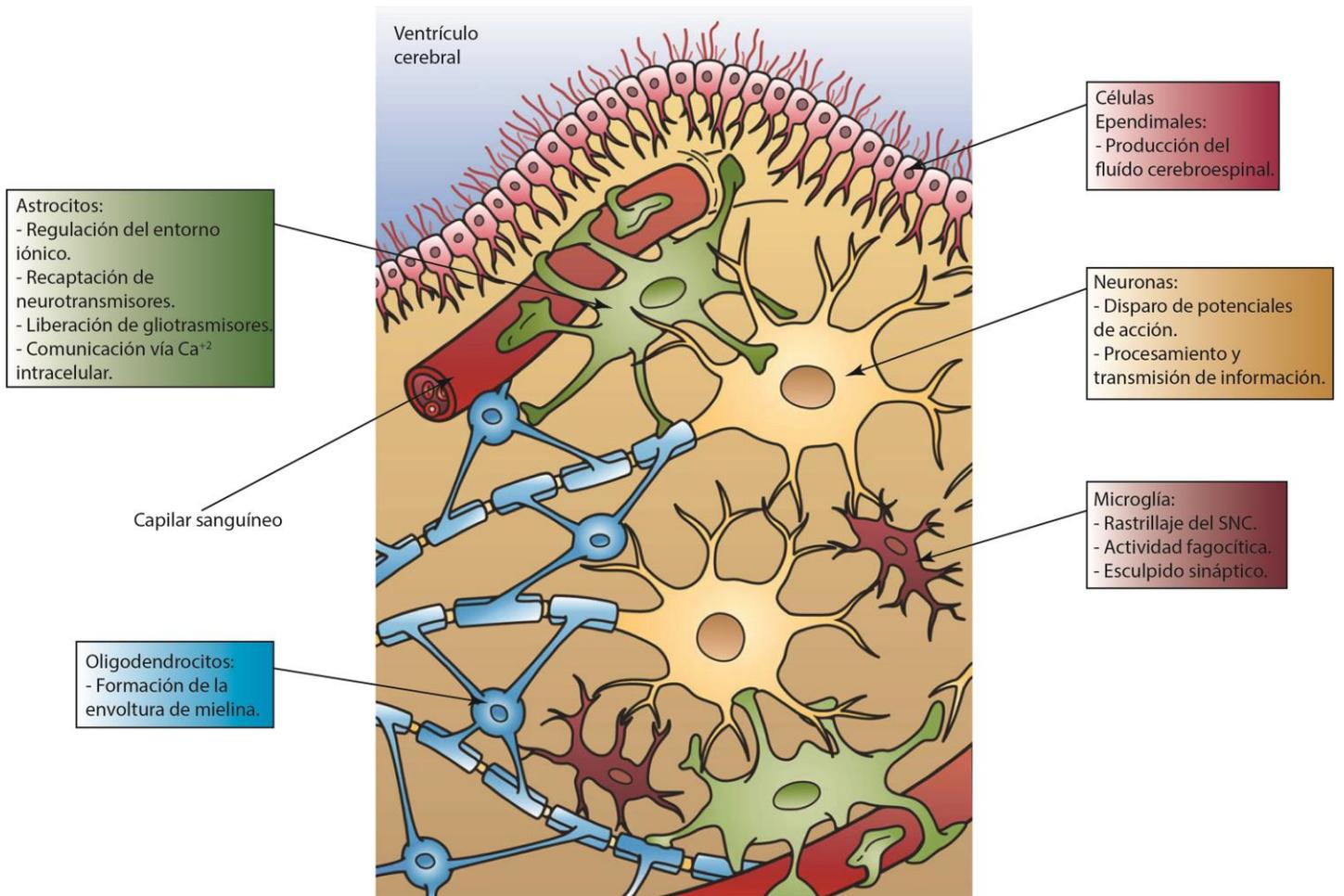
### Oligodendrocitos

Son las células responsables del aislamiento de los axones en el SNC, función que cumplen mediante la formación de una capa de mielina, compuesta en un 80% por lípidos. Una sola célula de este tipo puede envolver hasta 50 axones distintos. La formación de la capa de mielina es primordial para la eficiente transmisión eléctrica de las neuronas. Esto se evidencia en la severidad de las enfermedades que involucran procesos de desmielinización, como la esclerosis múltiple y enfermedades leucodistróficas.

### Células NG2

Las células que expresan el proteoglicano NG2 representan entre el 5-10% de las células gliales. En un principio se creía que eran un tipo de células precursoras de oligodendrocitos, pero se ha visto que pueden dar origen también a astrocitos y que en el cerebro adulto se encuentran en contacto con las sinapsis (Richardson et al. 2011). De hecho, las células NG2 responden a la actividad sináptica mediada por glutamato y GABA, lo que sugiere que además de actuar como una reserva de progenitores plásticos, estas células pueden formar una red glial que dialogue con las neuronas (Trotter et al. 2010).

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN



**Figura 2.1.1. Tipos de células del SNC.** Disposición simplificada y características principales de los diferentes tipos de células en el SNC de mamíferos. Adaptado de: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glial\\_Cell\\_Types.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glial_Cell_Types.png). Licencia Creative Commons: Holly Fischer, © Regents of the University of Michigan.

### 2.1.2 La búsqueda de la estrella<sup>1</sup>: los astrocitos.

Más allá de las características y funciones ya descritas de los astrocitos, en las últimas dos décadas se han realizado una serie de descubrimientos que han llevado a repostular la importancia y el rol de estas células.

Los componentes funcionales de la sinapsis suelen describirse solo por dos elementos: la terminal pre-sináptica, y la neurona post-sináptica. Sin embargo, muy frecuentemente, existe un tercer componente celular asociado: la glía. Esto se observa no sólo en el cerebro, en donde los astrocitos envuelven un gran número de sinapsis, sino también en el cerebelo (con la glía de Bergmann), en la retina (con las células de Müller), e incluso en el sistema nervioso periférico (con células de Schwann especializadas que envuelven la placa neuromuscular). De hecho, existe una comunicación bidireccional entre los componentes neurales y gliales que forman parte de la sinapsis (**Figura 2.1.2 A**). La liberación de un neurotransmisor por la terminal pre-sináptica no solo estimula la neurona post-sináptica, sino que también activa los astrocitos peri-sinápticos. A su vez, los astrocitos pueden liberar moléculas que alteren la excitabilidad neuronal post-sináptica o que actúen sobre la terminal pre-sináptica, afectando la liberación de neurotransmisores (Halassa et al. 2007). Por su analogía funcional con los neurotransmisores, estas moléculas se han denominado gliotransmisores, e incluyen moléculas tales como el glutamato, adenosina, ATP, D-serina, TNF- $\alpha$ , entre otros (Araque et al. 2014). Esta compleja relación entre estos tres elementos ha dado lugar a la denominación de las “sinapsis tripartitas”.

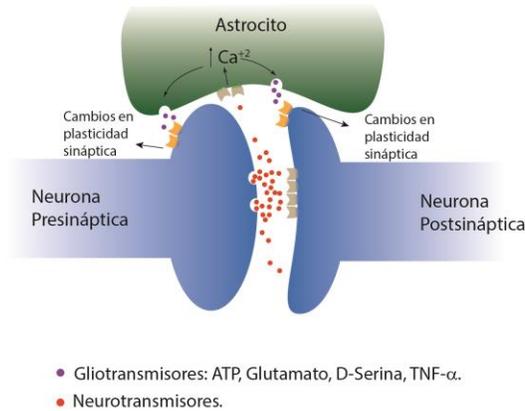
Se ha descrito además que la actividad sináptica es capaz de disparar señales de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular en los astrocitos adyacentes, produciendo ondas de calcio que se propagan entre diferentes células (**Figura 2.1.2 B**; Volterra et al. 2014; Pannasch et al. 2011). La activación de la vía de  $\text{Ca}^{+2}$  lleva a cambios funcionales en los astrocitos, incluyendo la liberación de gliotransmisores. Si bien los mecanismos y las condiciones en las que ocurre aún no se encuentran completamente definidas, hay fuertes evidencias que muestran que la liberación de gliotransmisores mediada por el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular está involucrada en la regulación de la actividad sináptica.

---

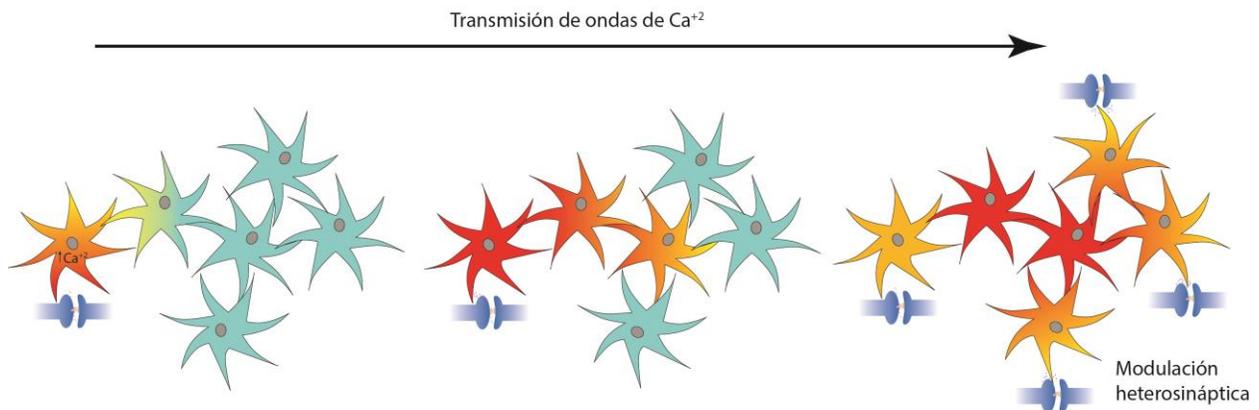
<sup>1</sup> Tema del disco: “Spinettalandia y sus Amigos” Luis Alberto Spinetta, 1971

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN

A)



B)



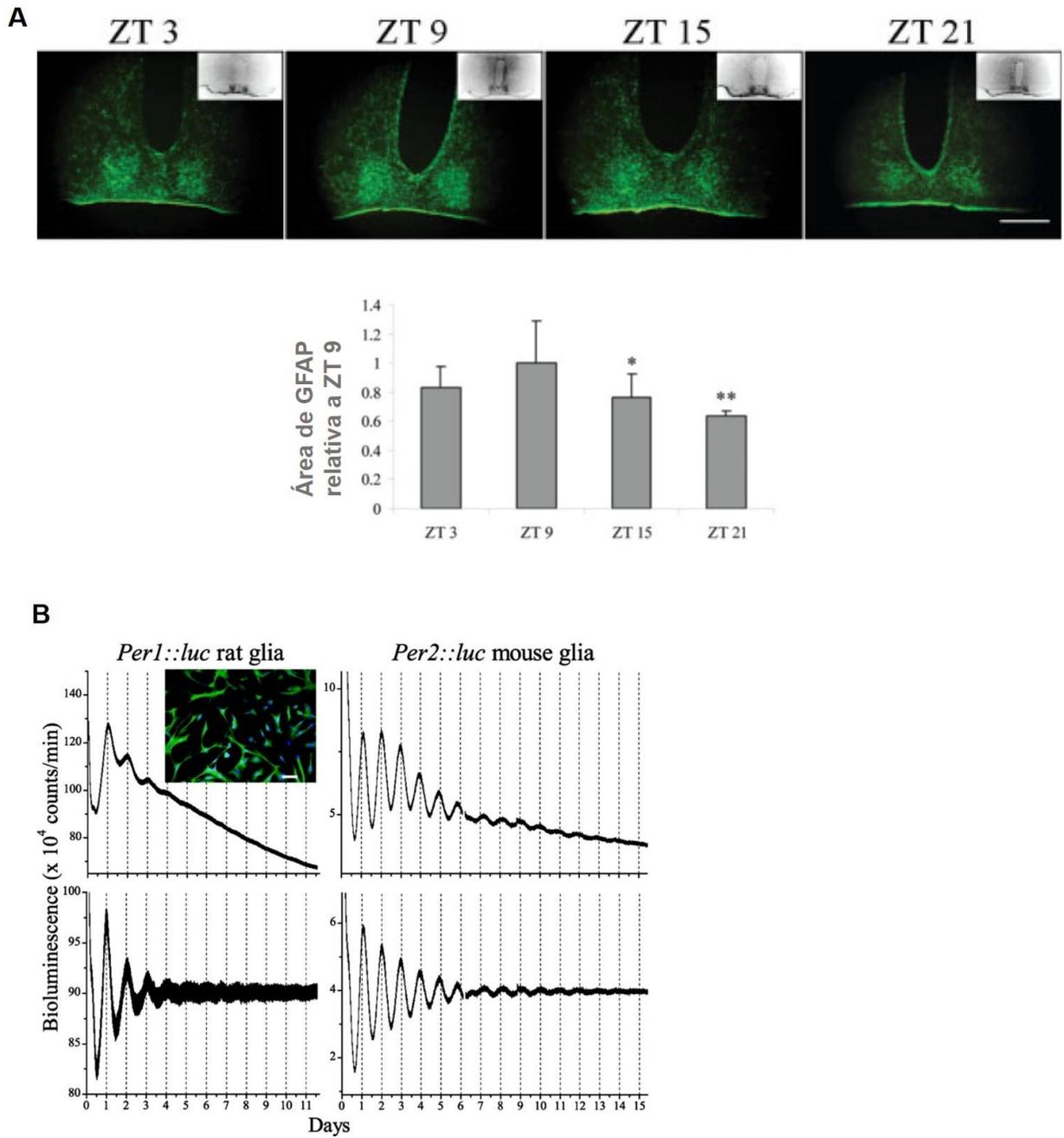
**Figura 2.1.2. A)** Estructura de la sinapsis tripartita. La unión entre la neurona pre- y postsináptica se encuentra en cercano contacto con una ramificación astrocítica. Los astrocitos son capaces de detectar la actividad sináptica mediante receptores para ciertos neurotransmisores presentes en su membrana. En respuesta a la actividad sináptica se incrementan los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. A su vez, los astrocitos pueden modular la actividad sináptica mediante la liberación de gliotransmisores, o regulando la recaptación de glutamato (no mostrado). **B)** Comunicación entre astrocitos: ondas de Calcio intracelular. Los astrocitos tienen la capacidad de comunicarse entre sí mediante la propagación de ondas de calcio vía uniones de tipo *gap* y liberación de ATP. Luego de detectar disparos neuronales, se produce un aumento en la concentración de calcio intracelular en la célula que está en contacto con esa sinapsis pero que a medida que transcurren los segundos se va generando una onda de calcio que se expande a partir del astrocito que fue inicialmente estimulado. Esto permite una modulación de la transmisión sináptica en lugares distantes a la actividad neuronal inicial.

#### 2.1.4 Los astrocitos y el reloj circadiano.

Los NSQ, sede del reloj biológico principal de mamíferos, están compuestos fundamentalmente por neuronas y astrocitos, y expresan una alta densidad de GFAP (marcador específico de astrocitos). A pesar de que el conocimiento acerca del rol de los astrocitos en el reloj circadiano es limitado, existen fuertes evidencias tanto de la importancia de la glía para el funcionamiento del reloj, como de oscilaciones circadianas en estas células (Jackson 2011).

La presencia de una marca intensa de GFAP en los NSQ ha llevado a los investigadores a evaluar la existencia de variaciones diarias en los niveles de esta proteína o en la morfología de los astrocitos. Se ha descrito que la inmunoreactividad de GFAP y la morfología de los astrocitos varía circadianamente en hamsters (Lavialle & Servière 1993). Estos resultados fueron luego extendidos a ratón, donde se observaron variaciones tanto diarias (**Figura 2.1.4 A**; Leone et al. 2006), como circadianas (en condiciones de oscuridad constante; Santos et al. 2005), con mayores niveles de expresión durante el día (o día subjetivo). El rol de esta variación circadiana en la inmunoreactividad de GFAP y en la morfología de los astrocitos es difícil de estudiar, pero probablemente esté asociado a la plasticidad de los NSQ y la modulación de la sincronización fónica (Girardet et al. 2010).

La capacidad de los astrocitos de funcionar como osciladores autónomos se ha confirmado mediante la utilización de reporteros bioluminiscentes de componentes del reloj molecular. Así, cultivos primarios de astrocitos de corteza, tanto de ratas *Per1-luc*, como de ratones *Per2<sup>luc</sup>*, muestran oscilaciones circadianas robustas (**Figura 2.1.4 B**; Prolo et al. 2005), que son capaces de sincronizarse a ciclos de temperatura.



**Figura 2.1.3. Ritmos circadianos en astrocitos. A)** Ritmos diarios en el área de cobertura de células GFAP positivas en los NSQ de ratón (Leone et al, 2006). **B)** Ritmos de expresión de *Per1*-luc en astrocitos de corteza de rata, y de *Per2*<sup>luc</sup> en astrocitos de corteza de ratón (Prolo et al, 2005).

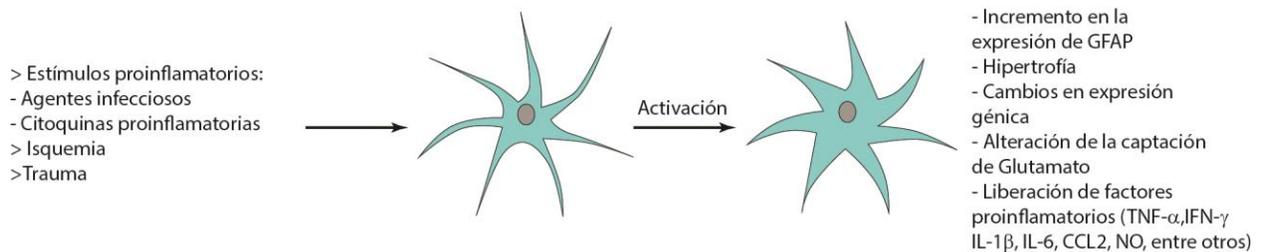
Respecto a las oscilaciones circadianas en las funciones de los astrocitos, hay evidencias de que el reloj de estas células puede controlar tanto la liberación de ATP como la recaptación de glutamato. Las oscilaciones en los niveles extracelulares de ATP se han descrito tanto a nivel de los NSQ, como de cultivos de astrocitos corticales, y en estas células son generadas por el mecanismo molecular canónico del reloj circadiano (Marpegan et al. 2011). En cuanto al glutamato, trabajos no publicados de nuestro laboratorio han demostrado que existen ritmos en la capacidad de captación de glutamato (que es mediada principalmente por astrocitos) en los NSQ (Leone y colaboradores, en preparación). Tanto el ATP como el glutamato son mediadores extracelulares cuyos niveles pueden ser controlados por los astrocitos, y que tienen importantes efectos en la comunicación sináptica.

En resumen, los astrocitos poseen un reloj circadiano funcional, que es capaz de sincronizarse a factores que median la transmisión de la información temporal en los NSQ, y son capaces de responder a la luz, lo que indicaría que podrían sincronizarse a estímulos ambientales, y mantener la coherencia temporal con el resto de las células de los NSQ. Además, los astrocitos podrían ejercer un control rítmico sobre el funcionamiento de las sinapsis de los NSQ, tanto mediante la liberación de ATP o el control de la recaptación de glutamato, como mediante cambios de plasticidad ultraestructural. Esta regulación podría fortalecer tanto el proceso de sincronización de los NSQ a la luz, como el acoplamiento entre las diferentes neuronas, proveyendo de mayor robustez al reloj biológico.

### **2.1.5 Los astrocitos como mediadores inmune-circadianos.**

Las funciones inmunes del SNC son llevadas a cabo por las células gliales, particularmente por la microglía y los astrocitos, así como por células infiltradas desde la periferia. Aunque la vigilancia inmunológica, así como la respuesta primaria a agentes proinflamatorios, está mediada principalmente por la microglía, los astrocitos también están involucrados en la generación y regulación de señales proinflamatorias. Los astrocitos sufren importantes cambios morfológicos y funcionales ante la detección de

señales asociadas a procesos infecciosos o de injuria (**Figura 2.1.4**). Una vez activados, los astrocitos responden mediante la secreción de una variedad de citoquinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ), quimioquinas (CXCL1,2,12, CCL2,5,10,19) o mensajeros gaseosos (NO), así como también alterando la captación de moléculas involucradas en la transmisión sináptica (Farina et al. 2007). Los astrocitos de los NSQ no son la excepción, y trabajos previos de nuestro grupo muestran que cultivos primarios de estas células responden a TNF- $\alpha$ , IL-1 y LPS activando la vía de señalización mediada por NF $\kappa$ B (un importante factor de transcripción en la respuesta inmune) (Leone et al. 2006). La activación de estas células también se evidenció *in vivo*, donde se vio que la administración central de un cóctel proinflamatorio induce un incremento de la expresión de GFAP (lo que se considera un paso necesario para la activación de los astrocitos) acompañado una morfología astrocitaria hipertrofiada (Deng et al. 2010).



**Figura 2.1.4. Activación de los astrocitos.** Los astrocitos son capaces de reconocer señales provenientes de situaciones inflamatorias o de injuria a través de receptores que reconocen patrones moleculares de patógenos (por ejemplo de tipo TLR), receptores para citoquinas o quimiocinas, y receptores asociados a patrones moleculares asociados a daño. En respuesta a estos estímulos se produce la transformación a astrocitos reactivos (o activados), con importantes cambios morfológicos y funcionales.

Las evidencias de que los astrocitos pueden responder a estímulos inmunes, y de que están implicados en la regulación de los ritmos circadianos, abren las puertas a la

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN

posibilidad de que estas células se encuentren involucradas en la respuesta del sistema circadiano a un estímulo inmune. En el presente capítulo analizaremos los efectos de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  sobre los astrocitos de los NSQ. Evaluaremos la respuesta del reloj circadiano de estas células a esta molécula, así como la capacidad de los astrocitos de modular el reloj circadiano, tanto a nivel molecular como en sus salidas comportamentales, ante la activación inmune.



## **Hipótesis y Objetivos del Capítulo 1.**

### **Hipótesis particular del Capítulo 1**

*Los astrocitos de los NSQ responden a la citoquina TNF- $\alpha$ , y su respuesta lleva a la modulación de los ritmos circadianos.*

Hipótesis específicas:

- El reloj molecular de los astrocitos de los NSQ es sensible a TNF- $\alpha$ .
- En respuesta a TNF- $\alpha$  los astrocitos secretan factores capaces de alterar la expresión de genes reloj.
- Los factores secretados por los astrocitos, en respuesta a TNF- $\alpha$ , pueden modificar el sistema circadiano *in vivo*.

### **Objetivo particular del Capítulo 1.**

*Analizar la respuesta de los astrocitos de NSQ a TNF- $\alpha$ , y los efectos de esta citoquina sobre los ritmos circadianos.*

Objetivos específicos:

- Analizar los efectos de TNF- $\alpha$  sobre la expresión de PER2 en astrocitos de los NSQ.
- Determinar si en respuesta a un estímulo transitorio con TNF- $\alpha$ , los astrocitos son capaces de secretar factores que alteren la expresión de Per1 en otros tipos celulares.

## CAPÍTULO 1 - OBJETIVOS

- Caracterizar cuáles son los factores secretados por los astrocitos en respuesta a TNF- $\alpha$  que alteren la expresión de Per1 en otras células.
- Analizar los efectos de los factores secretados por astrocitos en respuesta TNF- $\alpha$  sobre los ritmos de expresión de PER2 en los NSQ.
- Estudiar los efectos de los factores secretados por astrocitos en respuesta TNF- $\alpha$  en el sistema circadiano de ratón *in vivo*.
- Determinar si los efectos de la activación inmune de los astrocitos sobre el reloj circadiano *in vivo* están mediados por TNF- $\alpha$ .

## 2.2 Materiales y Métodos.

### 2.2.1 Animales.

#### Condiciones generales de mantenimiento.

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57-BL/6J, tanto animales *wild type* (Wt), como *knock out* del receptor TNF tipo 1 (TNFR1-) y ratones *knock in* mPer2<sup>luc</sup> (ver más abajo). Excepto que se indique lo contrario, se trabajó con machos adultos (2-5 meses, 25-32 gramos) mantenidos bajo un fotoperíodo de 12:12 (luz:oscuridad, L:O), con libre acceso a agua y comida. En el caso de experimentos realizados en condiciones de L:O, se utilizó como referencia la hora de apagado de las luces, denominada por convención ZT12. Los animales Wt y TNFR1- fueron mantenidos en el bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes, y los animales Per2<sup>luc</sup> se mantuvieron en el bioterio de la Escuela de Medicina de Morehouse, en Atlanta, EE. UU.

#### Animales mutantes.

Los animales TNFR1- provienen originalmente de The Jackson Laboratory (nombre de la cepa: B6.129-Tnfrsf1atm1Mak/J), y fueron gentilmente cedidos por la Dra. Silvia de Genaro de la Universidad Nacional de San Luis. Estos ratones poseen una inserción del cassette de neomicina en la posición 535 de la secuencia codificante del gen *Tnfr1*, que evita la expresión del mismo. El genotipo de los animales utilizados en este trabajo fue corroborado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo los protocolos provistos por The Jackson Laboratory (no mostrado).

En los ratones Per2<sup>luc</sup> la luciferasa de luciérnaga se encuentra fusionada al exón terminal del locus *Per2*. Estos animales fueron generados en el laboratorio del Dr. Joseph Takahashi (Yoo et al. 2004), y cedidos gentilmente al grupo del Dr. Alec Davidson en Atlanta, donde se utilizaron para este trabajo de tesis. Estos animales no presentan alteraciones en su sistema circadiano y, mediante la fusión de PER2 a una proteína reportera, es posible seguir su expresión a través del registro de bioluminiscencia.

### Registro de actividad locomotora.

Los animales se colocaron en jaulas individuales provistas con ruedas de locomoción. La actividad en rueda fue registrada mediante el sistema ARCHRON (Argentina), almacenando la cantidad de revoluciones de cada rueda cada cinco minutos. Los animales fueron expuestos inicialmente a un fotoperíodo L:O 12:12 por al menos 7 días, y luego transferidos a condiciones de oscuridad constante (O:O). Todos los tratamientos fueron realizados luego de mantener los animales por al menos 10 días en O:O. Bajo condiciones de O:O el horario de referencia utilizado corresponde al inicio de la actividad locomotora, que se fijó convencionalmente como CT 12.

### Cirugía de implantación de cánulas guía.

Los animales fueron anestesiados con un cocktail de de ketamina-xilacina (70 y 10 mg/kg, respectivamente). Una vez perdido el reflejo podal, se removió el pelo de la parte superior de la cabeza, y se situó a los animales en el marco estereotáxico (Stoelting) en el que se realizó la implantación de las cánulas guía de 26-gallon (Plastics One). Las cánulas fueron dirigidas a la parte inferior del tercer ventrículo, por sobre los NSQ (coordenadas relativas a Bregma: anteroposterior -0,5 mm, dorsoventral -5,0 mm y mediolateral 0,0 mm). Las cánulas fueron fijadas al cráneo mediante cemento dental, colocando previamente dos tornillos de sujeción en el hueso (Plastics One). Una vez recuperados de la anestesia, los animales se mantuvieron en L:O por al menos 48 h en jaulas individuales, y luego fueron transferidos a condiciones de O:O, para el registro de actividad locomotora.

### Administraciones intracerebroventriculares.

Para la administración intracerebroventricular (Icv), se utilizaron animales implantados con cánulas guía, tal como descrito anteriormente, y mantenidos en O:O. Las administraciones se realizaron a CT 15, bajo la iluminación con luz roja de baja intensidad. Los animales se sujetaron manualmente, se retiró el tapón de la cánula y se introdujo por la misma un inyector de 33-gallon (Plastics One) que sobresalía 0.1 mm del extremo de la cánula. En todos los casos se administró 1  $\mu$ l de volumen final, a un flujo de 0,2  $\mu$ l/minuto mediante una microjeringa (Hamilton), y, al final la administración, se

esperó 1 minuto antes de retirar el inyector y volver a colocar el tapón de la cánula. En el caso de que el mismo animal recibiera más de un tratamiento por vía Icv, los mismos se administraron con no menos de 10 días de separación entre cada uno.

### Perfusiones.

Los animales fueron anestesiados con una cocktail de ketamina-xilacina (150 y 10 mg/kg, respectivamente). Una vez perdido el reflejo podal, los animales se sujetaron a una superficie de disección, y se realizó una incisión longitudinal en la pared abdominal, cortando luego el diafragma para tener acceso a la cavidad torácica. Se colocó una aguja de 30-gallon en el ventrículo izquierdo del corazón, y se realizó una pequeña incisión en la aurícula derecha. En primer lugar, los ratones fueron perfundidos intracardiácamente con 15 ml de *buffer* fosfato salino (PBS) 0,01M, pH 7,4, y luego con 40 ml de fijador (paraformaldehído 4% en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7,4). Una vez que se confirmó el proceso de fijación (rigidez del animal), se procedió a remover los cerebros, que fueron post-fijados por 14-16 horas en la solución de fijador a 4°C. A continuación, los cerebros se sumergieron en una solución crioprotectora (PBS 0,01M, 30% sacarosa) por 24-48 hs y luego conservados a -80°C hasta su procesamiento para inmunohistoquímica (ver más adelante).

### **2.2.2 Cultivos de explantos de NSQ.**

Se utilizaron ratones Per2<sup>luc</sup> tanto machos como hembras. Los animales fueron sacrificados mediante CO<sub>2</sub> y posterior dislocación cervical 2-4 horas antes del apagado de las luces. Este horario fue elegido ya que se ha descrito que la disección durante el la segunda parte del día no altera la fase del reloj circadiano de los NSQ (Davidson et al. 2009). Luego de la decapitación, los cerebros fueron removidos y se sumergieron en solución salina balaceada de Hank (HBSS) suplementado con 10mM HEPES (pH 7,2), B27 (suplemento para cultivo de células del Sistema Nervioso Central, 2%, Life Technologies) y antibiótico-antimicótico. Se obtuvieron secciones coronales de 200 µm mediante un vibrátomo motorizado, manteniendo el tejido en la solución descrita anteriormente y conservando todo el sistema a 4°C. A partir de rodajas que contuvieran la región media (en sentido rostro-caudal) de los NSQ se procedió a diseccionar los

mismos bajo una lupa de disección y el tejido se colocó sobre una membrana (Millicell-CM, PICM030-50; Millipore) en una placa de Petri de 35 mm conteniendo 1,2 ml de medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; Life Technologies) suplementado con 10 mM HEPES (pH 7,2), 2% de B27, antibiótico-antimicótico y 0,1 mM de luciferina (Molecular Imaging Products). Las placas se mantuvieron a 37°C en un aparato de registro de bioluminiscencia (Lumicycle; Actimetrics).

### **2.2.3 Cultivo celular.**

#### Mantenimiento de la línea NIH 3T3.

Las células NIH-3T3 (ATCC N° CRL-1658) fueron generosamente cedidas por la Dra. Fernanda Ceriani (Fund. Instituto Leloir). Las mismas son fibroblastos derivados de tejido embrionario de ratón (cepa NIH/Swiss). La línea se mantuvo a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM suplementado con 10% de suero de ternero (PAA) y antibiótico-antimicótico, repicándolas cada 3 días.

#### Cultivos primarios de astrocitos de NSQ.

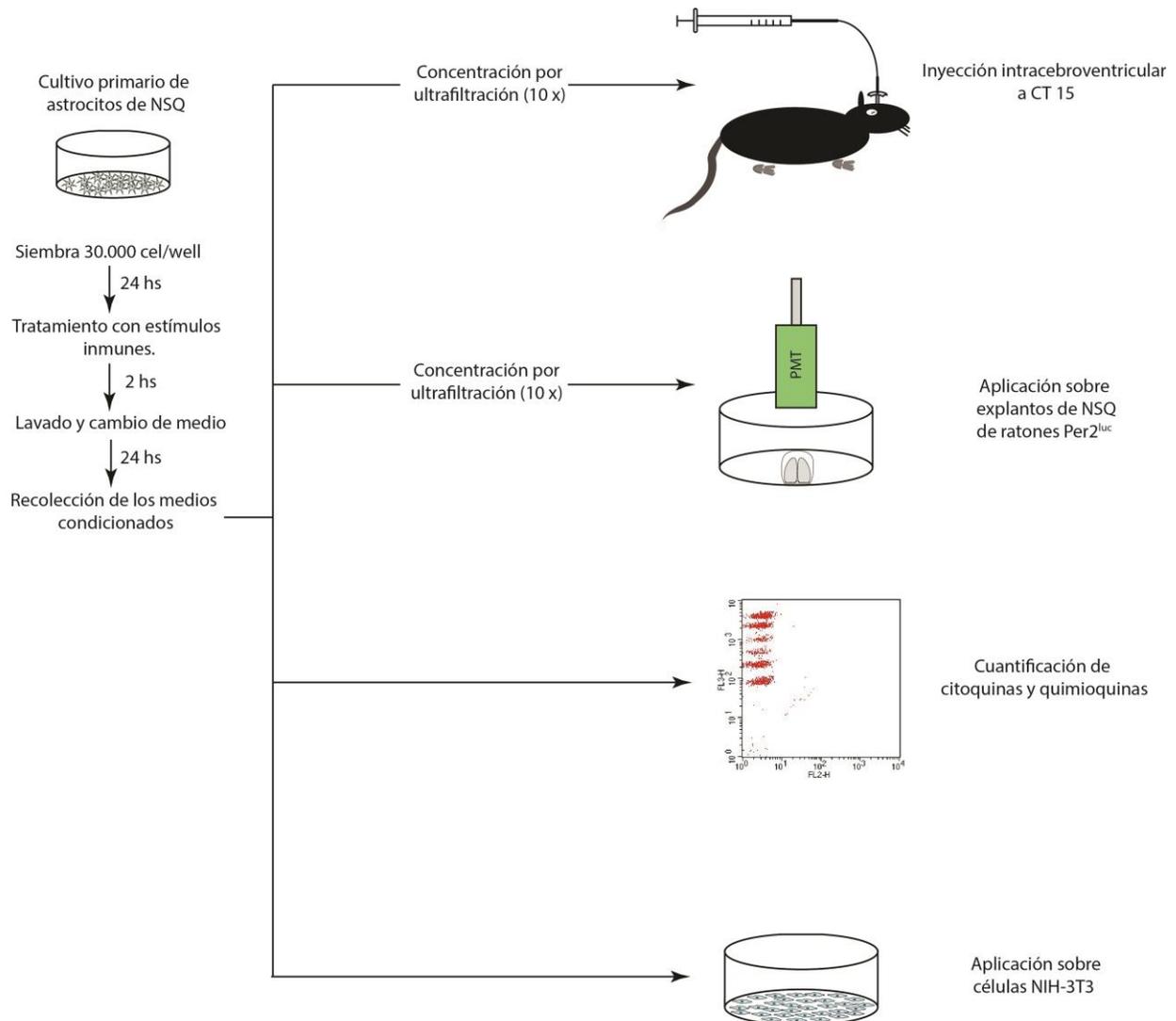
Se utilizaron entre 6-8 ratones (Wt o Per2<sup>luc</sup>, según correspondiera) neonatos de 0-4 días de edad por cultivo. Los animales fueron decapitados y las cabezas se transportaron a un gabinete de flujo laminar. Allí se obtuvieron los cerebros, que se mantuvieron en PBS frío hasta la disección. Luego de remover cuidadosamente las meninges, se diseccionó un bloque de tejido conteniendo los NSQ bajo lupa de disección. El tejido fue disociado mecánicamente por digestión con tripsina 0,25% + EDTA 1mM (Life Technologies) durante 20 minutos a 37°C. La suspensión celular se sembró en una botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie conteniendo medio DMEM suplementado con 10% de Suero fetal bovino (SFB; PAA) y antibiótico-antimicótico, y dos días más tarde se realizaron lavados con PBS seguido de un cambio de medio, de modo de remover las células que no sobrevivieron a la preparación. El cultivo se mantuvo en DMEM 10% SFB con antibiótico-antimicótico a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y se realizaron cambios de medio cada 3 días. Antes de cada cambio de medio se realizaron 2 lavados con PBS y las botellas fueron golpeadas entre cada lavado, de manera de remover las células más débilmente

adheridas. Una vez que los cultivos alcanzaban confluencia (aproximadamente 10-14 días), las células se repicaron y se sembraron en las placas o botellas correspondientes según el experimento. La pureza de los cultivos se corroboró mediante el marcado inmunocitoquímico de la proteína GFAP (ver **Figura 2.3.1**).

#### **2.2.4 Experimentos con medios condicionados de astrocitos.**

##### Obtención de los medios condicionados de astrocitos de NSQ.

Astrocitos provenientes de cultivos primarios de NSQ de ratones Wt se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pocillo. 24 horas más tarde los cultivos fueron tratados con: 2  $\mu\text{g/ml}$  de LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4 (Sigma-Aldrich), 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  (Peprotech), 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  (Sigma-Aldrich) o vehículo (PBS 0,01M). Luego de 2 horas se removieron los estímulos, las células fueron lavadas con PBS y permanecieron en medio DMEM libre de suero, si los medios condicionados se destinaron a administraciones *in vivo* (ver más adelante), o en DMEM suplementado con 1% SFB en otro caso. 24 horas más tarde se recolectaron los medios condicionados y se procesaron de la siguiente manera, dependiendo del experimento en para el que fueran utilizados: para la cuantificación de citoquinas y quimioquinas (ver más adelante) también se colectaron los medios condicionados 0 y 2 horas post estímulo y las muestras se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso; para las aplicaciones sobre rodajas de NSQ y para las administraciones Icv, los medios condicionados se concentraron en un factor de 10x, utilizando tubos de ultrafiltración con una membrana de corte de 3000 Daltons (Vivaspin 500; Sartorius) y se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso; finalmente en los experimentos *in vitro* (ver más adelante) los medios condicionados se aplicaron directamente sobre células de la línea NIH-3T3. De aquí en adelante, nos referiremos los medios condicionados de astrocitos tratados con LPS, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  o vehículo como MC-LPS, MC-TNF, MC-IL-1 y MC-Veh, respectivamente. En la **Figura 2.2.1** se esquematizan los protocolos utilizados en cada caso, para mayor claridad.



**Figura 2.2.1 Esquema de la generación de los medios condicionados por astrocitos y sus usos.**

Medición de citoquinas y quimioquinas en medios condicionados.

Para la cuantificación de citoquinas y quimioquinas presentes en los medios condicionados se utilizó el kit *Cytometric Bead Assay* de Becton Dickinson. Este kit permite la detección cuantitativa y simultánea de CCL2, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$  y

TNF- $\alpha$ . Cuenta con *beads* fluorescentes de distinta intensidad, conjugadas a anticuerpos dirigidos contra las citoquinas y quimioquinas descritas anteriormente. Una vez unidas a las beads, las moléculas son detectadas mediante un segundo anticuerpo conjugado a ficoeritrina (PE). La intensidad en el canal FL-2 (correspondiente a la PE) es proporcional a la cantidad de analito y las diferentes intensidades de fluorescencia del canal FL-3 de cada bead permite distinguir entre cada uno de los analitos y realizar una cuantificación simultánea de cada uno de ellos mediante citometría de flujo. Los medios condicionados fueron analizados mediante esta técnica en un equipo FACScalibur de BD, contabilizando 30000 eventos por cada muestra. Se corrieron además curvas con un rango de 0 a 5000 pg/ml de patrón de cada molécula a analizar. Se analizó también una muestra a  $t = 0$ , en la cual los valores de todas las moléculas se encontraban por debajo del límite de detección mediante el ajuste previamente mencionado.

#### Estimulación de células NIH-3T3 con medios condicionados.

Los efectos de los medios condicionados de astrocitos sobre la expresión de Per1 se analizaron mediante la activación de un constructo hPer1-luc, así como mediante la medición de la expresión relativa del ARNm de Per1 en células NIH-3T3 (**Figura 2.2.2**):

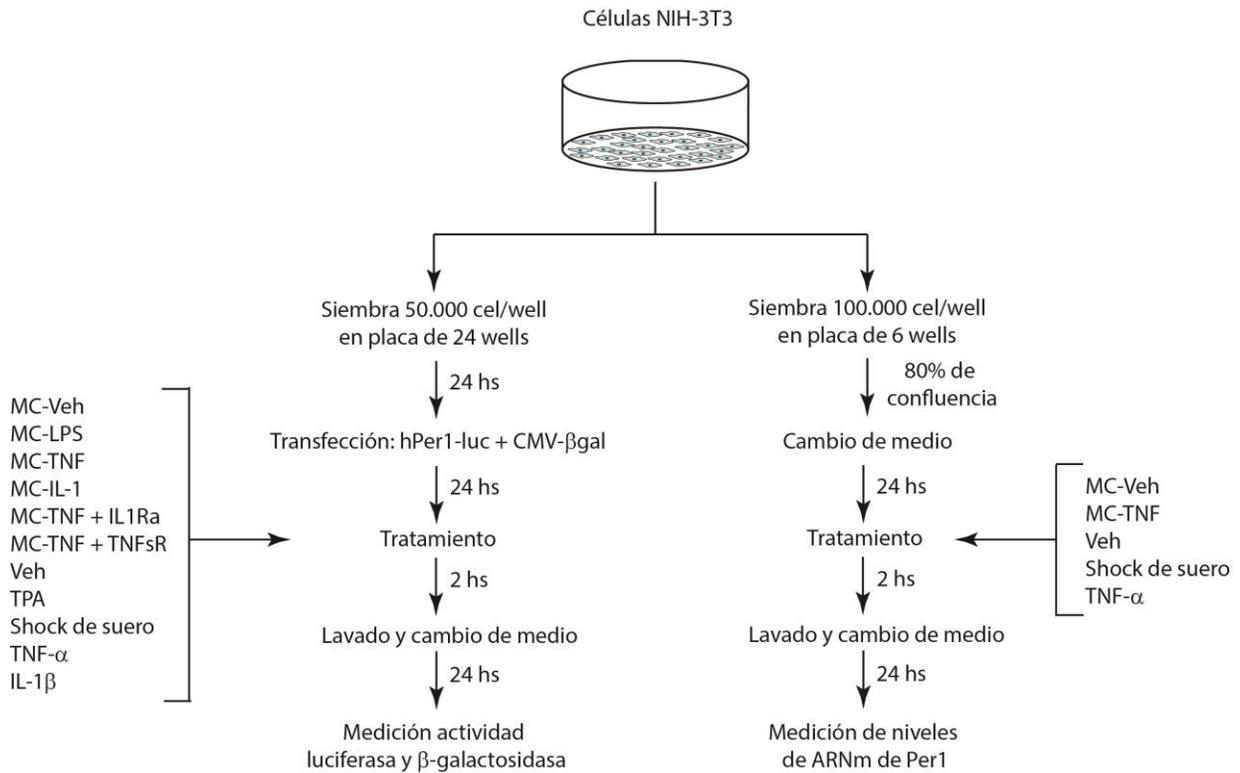
#### *Protocolo utilizando plásmido reportero.*

Se sembraron células de la línea NIH-3T3 en placas de 24 pocillos, a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo. 24 horas luego de la siembra, las células fueron co-transfectadas con un plásmido en el que la expresión de luciferasa se encuentra bajo el control del promotor del gen Per1 de humanos (hPer1-luc, cedido gentilmente por el Dr. Erik Maronde (Motzkus et al. 2002)) y con un plásmido que expresa la enzima  $\beta$ -galactosidasa bajo un promotor constitutivo (CMV- $\beta$ -gal). Se utilizaron 0,6 y 0,15  $\mu$ g de plásmido hPer1-luc y CMV-B-gal por pocillo, respectivamente. La transfección se realizó utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Life Technologies), usando una relación de  $\mu$ l de reactivo: $\mu$ g de DNA de 2:1, e incubando las células con DMEM sin suero ni antibióticos y con la mezcla de transfección durante 5 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de transefección y las células permanecieron en DMEM suplementado con 1% SFB y antibiótico-antimicótico. 24 horas más tarde las células fueron tratadas durante 2 horas

con alguno de los siguientes tratamientos: PBS, PMA (*Phorbol myristate acetate*, Sigma-Aldrich) 50 nM, TNF- $\alpha$  2, 20 y 200 ng/ml, IL-1 $\beta$  0,5, 5 y 50 ng/ml o el medio de cultivo fue reemplazado por MC-LPS, MC-TNF, MC-TNF con el agregado de 0,1  $\mu$ g/ml de antagonista del receptor de IL-1 (IL-1R, Valeant Pharmaceuticals), MC-TNF con el agregado de 0,1  $\mu$ g/ml de receptor soluble de TNF (TNFsR, Sigma-Aldrich), MC-IL-1, MC-Veh o DMEM 50% SFB. Pasadas las 2 horas, se removieron los tratamientos, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en DMEM suplementado con 1% SFB. 24 horas más tarde las células fueron lisadas mediante una incubación de 20 minutos con 100  $\mu$ l de *Reporter Lysis Buffer* (Promega), y posteriormente fueron desprendidas de la superficie de la placa mediante un rastrillo plástico. El volumen total de lisado fue recuperado, centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos, y guardado a -20°C hasta la medición de la actividad luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa y luciferasa (ver más adelante).

*Protocolo para posterior cuantificación de mRNA de mPer1.*

Las células NIH-3T3 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células/pocillo. Una vez que alcanzaron un 80%, y 24 horas después del último cambio de medio, las células se trataron con PBS, TNF- $\alpha$  (2 y 20 ng/ml) o el medio se reemplazó por DMEM 50% SFB, MC-TNF o MC-Veh. Luego de 2 horas de tratamiento, se retiró el medio, las células se lavaron con PBS y permanecieron en DMEM suplementado con 1% SFB por otras 24 horas. Pasado ese tiempo, se removió el medio, se agregó 1 ml de Trizol (Life Technologies) y las células se desprendieron de la superficie de la placa con la ayuda de un rastrillo plástico. Posteriormente, se procedió a la extracción del RNA y a la cuantificación de los niveles de mRNA de Per1 por PCR en tiempo real (ver más adelante).



**Figura 2.2.2 Esquema de los tratamientos realizados sobre las células NIH-3T3**

Tratamientos de explantos de NSQ con medios condicionados.

Los cultivos de explantos de NSQ se prepararon como se describe en 2.2.2 y se mantuvieron en el equipo de registro de luminiscencia (LumiCycle), que permite un seguimiento de los ritmos de bioluminiscencia en tiempo real. Se definió arbitrariamente a CT12 como el momento en el que ocurre el máximo de expresión de PER2, en cada ciclo. Los tratamientos se realizaron en el tercer ciclo circadiano de expresión de PER2, en dos fases del ritmo: CT 13-14 (1-2 horas después del pico de PER2) y CT 1-2 (1-2 después del mínimo de expresión de PER2). La determinación de la fase de expresión de PER2 se realizó según lo descrito en 2.2.11. Para el tratamiento, las placas conteniendo los explantos se sacaron del equipo de registro, y se mantuvieron sobre una manta térmica a 37°C. Se aplicaron 2 µl de MC-TNF o MC-Veh (preparados según lo ya descrito) directamente sobre los NSQ, y las placas volvieron a colocarse en el equipo

de registro, para continuar el seguimiento de la expresión de PER2. El tiempo que las placas permanecieron fuera del equipo no superó los 2 minutos en ningún caso.

#### Administración in vivo de medios condicionados.

Los medios condicionados se administraron intracerebroventricularmente en ratones canulados, tal como se describió en la sección **2.2.1**. El efecto de los tratamientos sobre los ritmos de actividad locomotora se analizó según **2.2.11**. Para analizar los efectos de los medios condicionados sobre la expresión de c-Fos en los NSQ, los ratones fueron perfundidos (**2.2.1**) 90 minutos luego de recibir una administración icv (**2.2.1**) y el tejido se procesó según lo descrito en **2.2.7**.

### **2.2.5 Efectos de estímulos inmunes en la expresión de PER2 de astrocitos.**

#### Tratamiento de cultivos primarios de astrocitos Wt.

Los cultivos primarios se prepararon tal como se describe en **2.2.3**, y una vez que alcanzaron confluencia se repicaron a placas de 24 pocillos, a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pocillo, en DMEM 10% SFB con antibiótico-antimicótico. Una vez que las células alcanzaron un 70% de confluencia fueron sincronizadas con un cambio de medio y fueron tratadas con TNF- $\alpha$  20 ng/ml 2 y 12 horas luego del cambio de medio. En ambos casos, 2 horas luego del tratamiento con TNF- $\alpha$ , los cultivos se retiraron de la estufa y se procesaron para la marcación inmunocitoquímica de PER2 (ver **2.2.6**).

#### Tratamiento de cultivos primarios de astrocitos Per2<sup>luc</sup>.

Los cultivos primarios de astrocitos de ratones Per2<sup>luc</sup> se realizaron tal como se describe en **2.2.3**. Una vez que los cultivos alcanzaron confluencia, fueron repicados y sembrados en placas tipo Primaria (Falcon) de 35 mm a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/placa de diámetro y mantenidas DMEM libre de suero, suplementado con 10 mM HEPES (pH 7,2), B27 2%, antibiótico-antimicótico y luciferina 0,1 mM. Las placas se sellaron con grasa siliconada estéril y se mantuvieron a 37°C en un aparato de registro de bioluminiscencia (Lumicycle, Actimetrics). En el segundo o tercer ciclo de expresión

de PER2, los cultivos se retiraron del Lumicycle por menos de 2 minutos, se mantuvieron sobre una manta térmica a 37°C y se les aplicaron 20 µl de TNF-α o LPS disuelto en PBS (concentración final en la placa 20 ng/ml y 2 µg/ml, respectivamente) o Vehículo. Posteriormente, las placas volvieron a colocarse en el equipo de registro, para continuar el seguimiento de la expresión de PER2. En el caso del tratamiento con TNF-α, el estímulo se realizó en dos fases del ritmo de expresión de PER2, a CT 14 o a CT 0. En el caso del tratamiento con LPS, el estímulo sólo realizó a CT 14. La determinación de la fase de expresión de PER2 y el análisis del efecto de los tratamientos sobre los ritmos de PER2 se realizó según lo descrito en **2.2.11**.

### **2.2.6 Inmunofluorescencia de cultivos.**

Los cultivos primarios de astrocitos fueron marcados contra GFAP, TNFR y PER2. Los cultivos se prepararon tal como se describe en **2.2.3** y se sembraron en placas de 24 pocillos, tal como se describió anteriormente. Las células se lavaron con PBS 0,01M y se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS 0,01M por 20 minutos. Posteriormente fueron lavadas con PBS y deshidratadas con metanol por 2 minutos. A continuación se bloquearon posibles fuentes de unión inespecífica mediante incubación con una solución de leche descremada al 5%, disuelta en PBS 0,01M con 0,04% de Tritón X-100 (PBST 0,04%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron con anticuerpos primarios contra GFAP (1:1000 en PBST 0,04%; Dako), TNFR1 (1:50 en PBST 0,04%; Santa Cruz Biotechnology) o PER2 (1:2000 en PBST 0,04%; Alpha Diagnostics) a 4°C por 24 horas, en el caso de GFAP y TNFR1, y por 48 horas en el caso de PER2. Luego de 4 lavados con PBST 0,04%, las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti Fc de conejo, conjugado con FITC (Vector Labs), por 2 horas a temperatura ambiente. Luego las células se lavaron, y realizó una contratinción de los núcleos celulares con DAPI (Vector Labs) y se observaron en un microscopio invertido de epifluorescencia Eclipse TE2000-U (Nikon). En todos los casos se realizaron controles evitando el uso de anticuerpo primario.

### **2.2.7 Inmunohistoquímica de tejido de cerebro.**

Los cerebros se obtuvieron tal como se describe en **2.2.1**, y se obtuvieron secciones coronales, conteniendo los NSQ, de 40  $\mu\text{m}$  utilizando un crióstato (Leica). Los cortes fueron lavados con PBS 0,01 M y luego con PBST 0,4%. Se bloquearon los posibles sitios de unión inespecíficas mediante incubación con una solución de leche descremada 5% en PBST 0,4% durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron con anticuerpos contra c-Fos (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) en PBST 0,4% por 48 horas a 4°C. Luego los cortes fueron lavados con PBST 0,4% y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (Vector, 1:200 en PBST 0,4%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBST 0,4% y con PBS, se realizó un bloqueo de la peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3% en PBS, por 15 minutos. A continuación se realizaron lavados con PBS y se realizó una incubación con Avidina-peroxidasa (1:200, Vector) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBS, se realizó la reacción de revelado utilizando el kit VIP de Vector. A continuación los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio, y se deshidrataron por incubación en alcoholes de concentración creciente y finalmente se incubaron en xileno y se colocó el cubreobjeto con medio de montaje sintético (bálsamo de Canadá). En todos los casos se realizaron controles evitando el uso de anticuerpo primario. Los cortes se observaron en un microscopio Olympus Bx41 y se tomaron imágenes mediante una cámara Q-color 3 (Olympus).

### **2.2.8 Expresión de ARNm.**

#### Extracción de ARNm y síntesis de ADNc.

Se obtuvieron lisados celulares en Trizol, tal como se describió en **2.2.4.3**. Para la extracción de ARN se agregaron 20 $\mu\text{l}$  de cloroformo frío por ml de Trizol, se agitó e incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 12000g durante 15 minutos a 4°C, y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo estéril. Se agregó 50 $\mu\text{l}$  de Isopropanol frío, se mezcló y se incubó a -20°C por 2 horas. Luego, se centrifugó a 12000g durante 10 minutos a 4°C para obtener el pellet de ARN. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 100 $\mu\text{l}$  de Etanol 75% frío, se mezcló y centrifugó a

7500g durante 5 minutos a 4°C. Se dejó secar el pellet durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se resuspendió en 20µl de agua destilada estéril. Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop1000 (Thermo Scientific). A continuación se sintetizó el ADNc a partir de 200ng de RNA total utilizando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Life Technologies) con oligonucleótidos OligodT.

#### PCR en tiempo real.

Se realizó una reacción de PCR en tiempo real utilizando el equipo Step One Plus (Applied Biosystems) y la mezcla de reacción Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). El ciclado utilizado fue 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizaron curvas con distintas concentraciones de ADNc molde para calcular la eficiencia de amplificación de los primers y el tamaño del producto se chequeó por corrida electroforética en gel de agarosa. La secuencia de *primers* utilizados fue: Per1 *forward*, 5'-CATTCCGCCTAACCCCATATG-3', Per1 *reverse*, 5'-CGGGGAGCTTCATAACCAGAG-3', HPRT *forward*, 5'-TGTTGGATACAGGCCAGAC-3', HPRT *reverse*, 5'-TGGCAACATCAACAGGACTC-3'.

#### **2.2.9 Mediciones puntuales de actividad luciferasa.**

Los lisados celulares fueron obtenidos tal como se describe en **2.2.4.3**. La actividad luciferasa presente en los mismos fue medida en 15 µl de extracto, a los que se les agregaron 50 µl de reactivo para ensayo de luciferasa (Luciferase Assay System, Promega) y la bioluminiscencia emitida fue cuantificada en un luminómetro Trialthler Multilabel Tester (en el Laboratorio de la Dra. Mónica Costas).

#### **2.2.10 Mediciones de actividad β-galactosidasa.**

La actividad β-galactosidasa se evaluó mediante una reacción colorimétrica de conversión de orto-nitro-fenil-galactósido (ONPG) en un compuesto coloreado. Para ello, se incubaron 30 µl de lisado celular (obtenidos según lo descrito en **2.2.4.3**) con igual volumen de Buffer βgal 2x (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM pH 7,3, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, β-mercaptoetanol

100 mM y ONPG 1,33 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo por el agregado de 30 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en frío. La aparición de producto coloreado se cuantificó por medición de absorbancia a 420 nm.

### **2.2.11 Análisis de datos y estadística.**

#### Análisis de ritmos de actividad locomotora.

Los análisis de los efectos de los tratamientos sobre los ritmos de actividad locomotora se realizaron con el software El Temps (versión 1.219), desarrollado por Antoni Diez Noguera en la Universidad de Barcelona. Para la cuantificación de los cambios de fase, se trazó una línea que uniera el inicio de la actividad locomotora para los 10 – 15 días previos al tratamiento, y luego se realizó lo mismo (usando una línea con la misma pendiente) para los 10 – 15 días posteriores al tratamiento. La diferencia en la fase entre ambas líneas, al día inmediatamente posterior al tratamiento fue considerado el cambio de fase. Este procedimiento fue realizado por cuatro observadores independientes, que desconocían el grupo o tratamiento que se estaba analizando. El valor promedio entre los cálculos de cada observador fue utilizado como medida del cambio de fase para el análisis estadístico. Los efectos de los tratamientos sobre la fase de actividad locomotora fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguido la prueba de comparaciones múltiples *a posteriori* de Sidak.

#### Análisis de los ritmos de expresión de PER2 por bioluminiscencia.

El análisis de estos datos se realizó con el software Lumicycle Analysis (Actimetrics). Como ya se indicó, en estos experimentos se definió CT 12 como el momento en que ocurre el máximo en la señal de luminiscencia. Para el cálculo de cambios de fase, se ajustó en los ciclos previos al tratamiento una onda senoidal, con atenuación en la amplitud a lo largo de la serie temporal (*damping*), mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt. A partir del período arrojado por este ajuste, se calculó cuándo debiera ocurrir el pico siguiente al tratamiento (pico esperado), sumando a la hora en la que ocurrió el pico previo, la cantidad de horas que correspondiera al período ajustado. La diferencia entre el momento en que debía ocurrir el pico esperado, y el momento en que ocurrió el

primer pico luego del tratamiento se consideró el cambio de fase. Las diferencias en los cambios de fase entre los distintos grupos fue analizada por ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, en el caso de los experimentos con cultivos de astrocitos y por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak en el caso de los experimentos con explantos de NSQ.

Para los cálculos de amplitud relativa la distancia entre el máximo y el mínimo de cada ciclo post tratamiento se dividió por la distancia entre máximo y mínimo del ciclo previo al tratamiento. Los efectos sobre la amplitud post tratamiento, tanto en los cultivos de astrocitos como en los explantos de NSQ, se testearon mediante ANOVA de dos vías. Los efectos de distintas dosis de TNF- $\alpha$  sobre la amplitud post tratamiento en cultivos de astrocitos se analizaron mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas.

#### Análisis de la cuantificación de citoquinas y quimioquinas mediante CBA kit.

El análisis de los resultados se realizó mediante el software BD CBA Analysis. Brevemente, se discriminó entre las distintas intensidades de cada bead (asociadas a cada analito), según la fluorescencia en el FL3, y, a partir de las intensidades en el FL2 (proporcional a la cantidad de moléculas de analito presentes) de la curva patrón, se construyó una curva de calibración y se ajustó a un modelo de 4 parámetros (no lineal) para cada analito:

$$y = \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d$$

Donde:

x = concentración del patrón

y = intensidad de fluorescencia en FL-2

a = valor de y en la asíntota a valores bajos de x

b = pendiente

c = punto medio entre a y d

d = valor de y en la asíntota a valores altos de x

A partir del ajuste y de los valores de intensidad de fluorescencia para cada muestra, se calculó la concentración de cada analito para cada muestra. Las diferencias en los

niveles de cada molécula en cada grupo se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak.

#### Expresión de Per1-luc.

Los valores de actividad luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa se obtuvieron tal como se describe en **2.2.9** y **2.2.10**. Las cuentas de luminiscencia obtenidas se normalizaron a los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa para cada muestra y se denominaron Unidades relativas de luminiscencia (RLU). A su vez, esos valores fueron relativizados al promedio de los valores obtenidos en el grupo control para cada caso. Las diferencias entre los distintos tratamientos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de las pruebas a posteriori de Dunnett o Tukey, según correspondiese.

#### Expresión de PER2 endógeno.

Las imágenes de cultivos inmunomarcados contra PER2 se obtuvieron tal como se describió en **2.2.6**. El análisis de imágenes se realizó mediante el software ImageJ. Para todas las imágenes se realizó una substracción del *background* tomando un valor de *Rolling ball radius* de 50 píxeles. La intensidad de la señal de PER2 se cuantificó demarcando un área de análisis (ROI) que se ubicase en el núcleo, citoplasma o que abarcara a ambos. La intensidad de la señal de fluorescencia se normalizó a la superficie que tuviera el área de interés. Los efectos del tratamiento y del tiempo post cambio de medio se analizó mediante ANOVA de dos vías, seguida por la prueba a posteriori de Tukey.

#### Expresión de c-Fos.

Las imágenes de cortes conteniendo los NSQ inmunomarcados contra c-Fos se obtuvieron según **2.2.7**. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ. Se definieron dos ROI que se ajustaran a las regiones anatómicas de core y shell de los NSQ y se contó el número de células marcadas en ambas regiones mediante la herramienta “*Cell counter*” del software. Los efectos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para cada región y para la suma de core + shell.

### Expresión de ARNm de Per1.

La expresión relativa de Per1 se calculó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Brevemente, los valores de ciclo umbral (Ct) de cada duplicado técnico se promediaron, y para cada muestra se calculó la diferencia entre el Ct ( $\Delta Ct$ ) de la amplificación de Per1 y el Ct de la amplificación de el gen de hypoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT, control endógeno). Luego, para cada muestra se calculó la diferencia ( $\Delta\Delta Ct$ ) entre el  $\Delta Ct$  de esa muestra y el promedio los  $\Delta Ct$  de las muestras tratadas con vehículo. Si la eficiencia de amplificación es 2, al calcular el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para cada muestra, se obtiene un valor de expresión relativa de Per1, relativizado tanto a la expresión del control endógeno como al promedio de las muestras tratadas con vehículo. La eficiencia de amplificación se corroboró mediante curvas de calibración y también mediante el análisis de las curvas de amplificación con el software LinReg. Los efectos de cada tratamiento se analizaron mediante ANOVA seguido de la prueba de Dunnet.

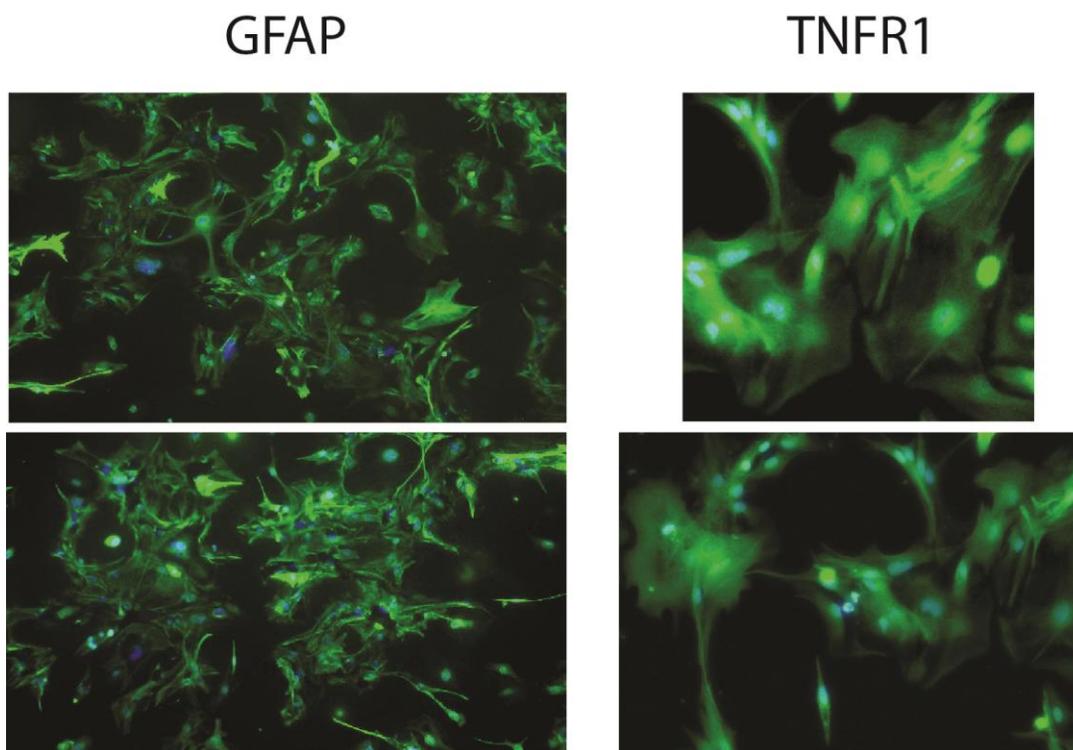
En todos los casos el software utilizado para el análisis estadístico fue el GraphPad Prism Software, versión 5.0 o 6.0 y se consideraron estadísticamente significativos los efectos o diferencias con un  $p < 0,05$ . Los datos mostrados se representan como la media  $\pm$  el error estándar.



## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Caracterización de los cultivos primarios de astrocitos de NSQ.

Con el fin de caracterizar los cultivos primarios que se utilizaron en los distintos experimentos de este capítulo, se realizaron marcaciones rutinarias contra la proteína GFAP. El porcentaje de células GFAP positivas fue siempre superior al 95%, en todos los cultivos testeados (**Figura 2.3.1** panel izquierdo). A su vez, se comprobó la expresión del receptor TNFR1 los astrocitos de NSQ.



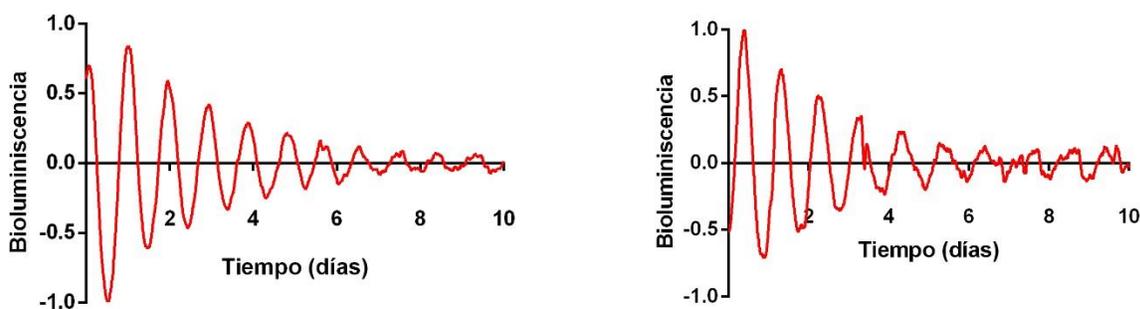
**Figura 2.3.1** Expresión de GFAP y TNFR1 en cultivos primarios de astrocitos de NSQ. **Panel Izquierdo:** Cultivos primarios de astrocitos de NSQ marcados contra GFAP (verde), con marcación nuclear en azul. **Panel Derecho:** Cultivos primarios de astrocitos de NSQ marcados contra receptor TNFR1 (verde), con marcación nuclear en azul. Se observa una marca difusa sobre toda la superficie celular. Aumento 400X en ambos casos.

### 2.3.2 Efectos de estímulos inmunes en la expresión de PER2 en astrocitos de NSQ.

Tal como se mencionó anteriormente, TNF- $\alpha$  actúa como mediador inmune a nivel de los NSQ, siendo partícipe necesario en la respuesta del reloj a estímulos inmunes periféricos. A su vez, se ha descrito que esta citoquina, y otros factores proinflamatorios, son capaces de alterar la expresión de genes reloj in vitro. Por esto, nos abocamos a estudiar si el reloj molecular de los astrocitos de NSQ es sensible a esta citoquina. Para ello analizamos el efecto de TNF- $\alpha$  sobre los ritmos de expresión de PER2 en astrocitos provenientes de ratones Per2<sup>luc</sup>, así como en cultivos provenientes de ratones Wt.

#### 2.3.2.1 Efectos sobre los ritmos de expresión en astrocitos Per2<sup>luc</sup>.

Los cultivos primarios de astrocitos de NSQ de ratones Per2<sup>luc</sup> presentaron una expresión rítmica de Per2 que perduró por al menos por 6-8 días (**Figura 2.3.3**), con un período promedio de  $22,8 \pm 0,8$  horas y los cultivos pudieron resincronizarse por un cambio de medio de cultivo. Estos resultados se asemejan a los encontrados por Prolo y colaboradores (2005) en cultivos de astrocitos de corteza, donde el período descrito fue de 22,4 horas.



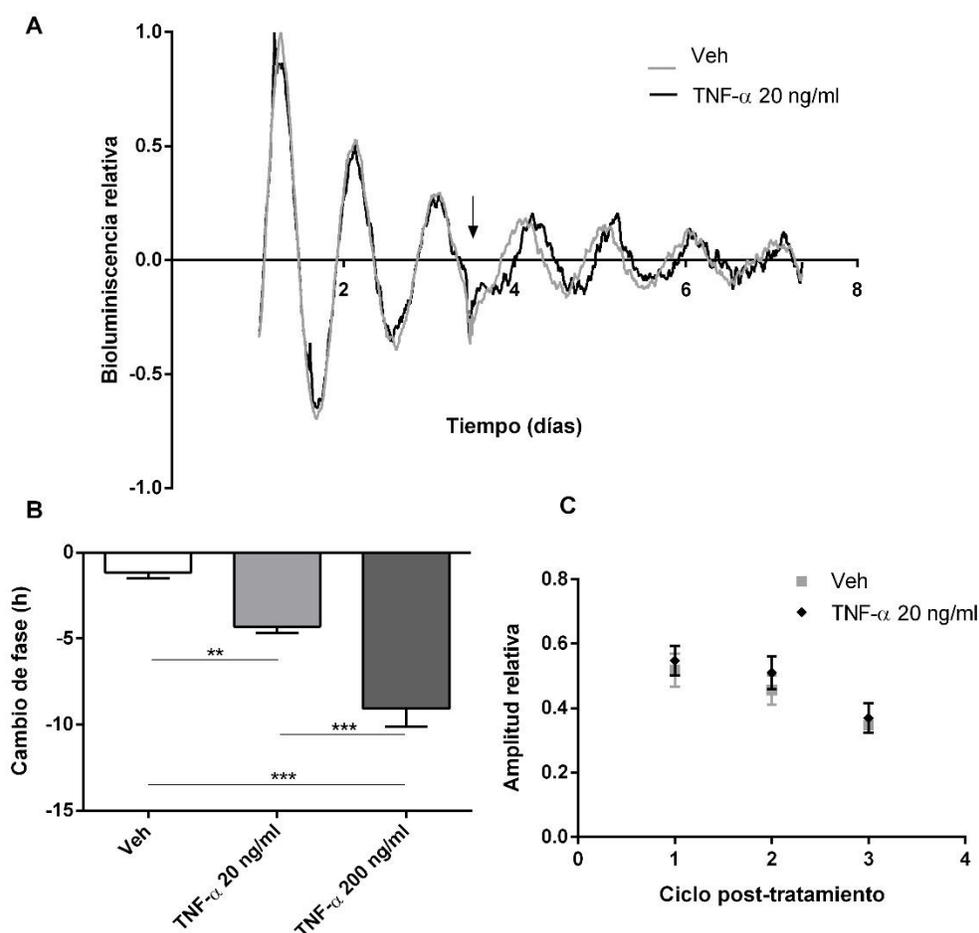
**Figura 2.2.2** Ejemplos de ritmos de bioluminiscencia en cultivos primarios de astrocitos de NSQ de ratones Per2<sup>luc</sup>.

Los cultivos fueron tratados con TNF- $\alpha$  en dos fases distintas de los ritmos de expresión de PER2: 2 horas luego del máximo (CT 14), y en el mínimo (CT 0) de la misma.

Los cultivos tratados con 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  a CT 0 mostraron retrasos en la fase de los ritmos de bioluminiscencia, comparados con el control en el que administró vehículo

CAPÍTULO 1 – RESULTADOS

( $-4,3 \pm 0,4$  y  $-0,9 \pm 0,7$  horas, respectivamente). Estos retrasos fueron dosis-dependientes, encontrado un cambio de  $-9,1 \pm 1,1$  horas en los cultivos tratados con 200 ng/ml de TNF- $\alpha$  (ANOVA seguido de prueba de Tuckey,  $p < 0,01$  para vehículo contra TNF- $\alpha$  20 ng/ml,  $p < 0,001$  para vehículo contra TNF- $\alpha$  200 ng/ml,  $p < 0,001$  para TNF- $\alpha$  20 ng/ml contra TNF- $\alpha$  200 ng/ml y  $p > 0,05$  para los demás contrastes,  $n = 4$ , **Figura 2.3.3**). Por otro lado, el tratamiento con TNF- $\alpha$  a CT 0 no mostró ningún efecto en la amplitud de los ritmos de PER2, en ambas dosis ensayadas (se muestran los resultados con 20 ng/ml; ANOVA de dos vías de medidas repetidas,  $p > 0,05$  para el tratamiento,  $p < 0,01$  para el número de ciclo,  $p > 0,05$  para la interacción, en ambas dosis,  $n = 4$ , **Figura 2.3.3**).

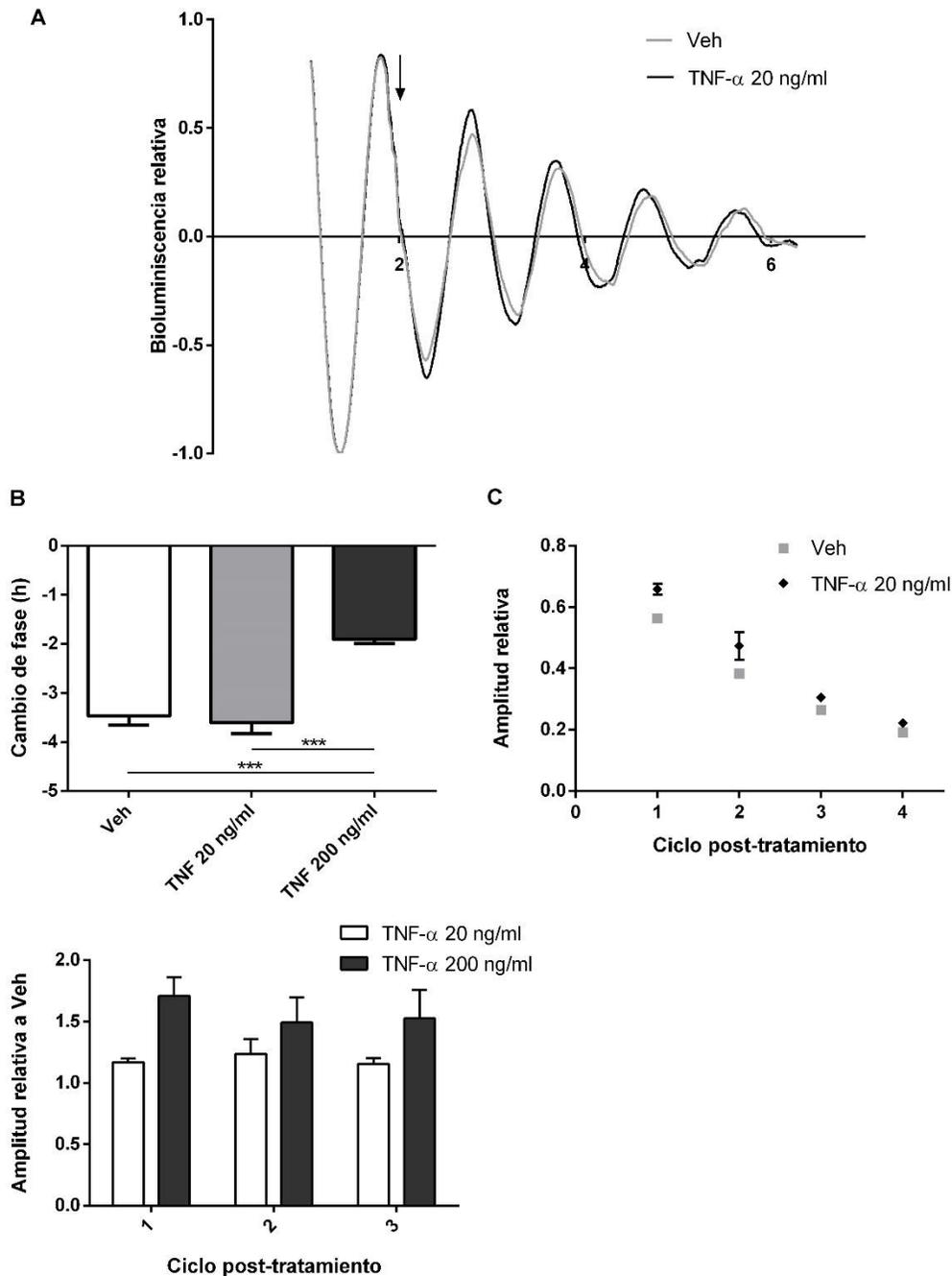


**Figura 2.3.3 (Página anterior). El tratamiento con TNF- $\alpha$  a CT 0 altera la fase del reloj de los astrocitos de NSQ. A)** Niveles de expresión de Per2<sup>luc</sup> en dos cultivos primarios de astrocitos, que recibieron TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) o vehículo a CT 0. **B)** Cambios de fase inducidos por TNF- $\alpha$  aplicado a CT 0 en astrocitos de NSQ. **C)** Efectos sobre la amplitud de los ritmos de expresión de Per2<sup>luc</sup> del tratamiento con TNF- $\alpha$  20 ng/ml en astrocitos de NSQ.

A continuación, evaluamos si los efectos de TNF- $\alpha$  sobre el reloj circadiano de astrocitos de NSQ dependen del momento o fase en la que se realice el tratamiento. Hallamos que, a diferencia de lo que ocurre en los cultivos tratados a CT 0, el tratamiento de cultivos de astrocitos de NSQ con vehículo a CT 14, produjo un retraso de fase de los ritmos de PER2 de  $3,7 \pm 0,2$  horas, y el tratamiento con 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  a CT 14 no produjo un efecto en la fase diferente del control. Sin embargo, el tratamiento con una dosis más alta de TNF- $\alpha$  (200 ng/ml) indujo retrasos de fase significativamente menores que los del vehículo (ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tuckey,  $p < 0,001$  para TNF- $\alpha$  200 ng/ml contra vehículo,  $p < 0,001$  para TNF- $\alpha$  200 ng/ml contra TNF- $\alpha$  20 ng/ml,  $p > 0,05$  para los demás contrastes,  $n = 6$ , **Figura 2.3.4**). Por otro lado, a diferencia de lo que ocurrió con los tratamientos a CT 0, la aplicación de TNF- $\alpha$  sobre los cultivos de astrocitos a CT 14 indujo un incremento en la amplitud de los ritmos de PER2, tanto en la dosis de 20 ng/ml (ANOVA de dos vías con medidas repetidas  $p < 0,01$  para el efecto del tratamiento,  $p < 0,0001$  para el efecto del número de ciclo,  $p > 0,05$  para la interacción, **Figura 2.3.4**) como en la de 200 ng/ml (ANOVA de dos vías con medidas repetidas  $p < 0,001$  para el efecto del tratamiento,  $p < 0,0001$  para el efecto del número de ciclo,  $p < 0,05$  para la interacción; Prueba de Sidak a posteriori:  $p < 0,001$  para el contraste entre TNF- $\alpha$  y vehículo en el primer ciclo,  $p < 0,05$  para el contraste entre TNF- $\alpha$  y vehículo en el segundo ciclo y  $p > 0,05$  para los contrastes en los ciclos 3 y 4;  $n = 6$ , **Figura 2.3.4**). Para comparar los efectos de las dosis 20 y 200 ng/ml entre sí, los valores de amplitud relativa para cada experimento (con 20 y 200 ng/ml de TNF- $\alpha$ ) se relativizaron a la media de los valores del control con vehículo de ese mismo experimento. Al comparar el efecto sobre la amplitud de cada una de las dosis, no se

encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con 20 ng/ml y con 200 ng/ml de TNF- $\alpha$  (ANOVA de dos vías de medidas repetidas,  $p < 0,05$  para los efectos de la dosis, del número de ciclo y de la interacción;  $n = 4 - 6$ , **Figura 2.3.4**).

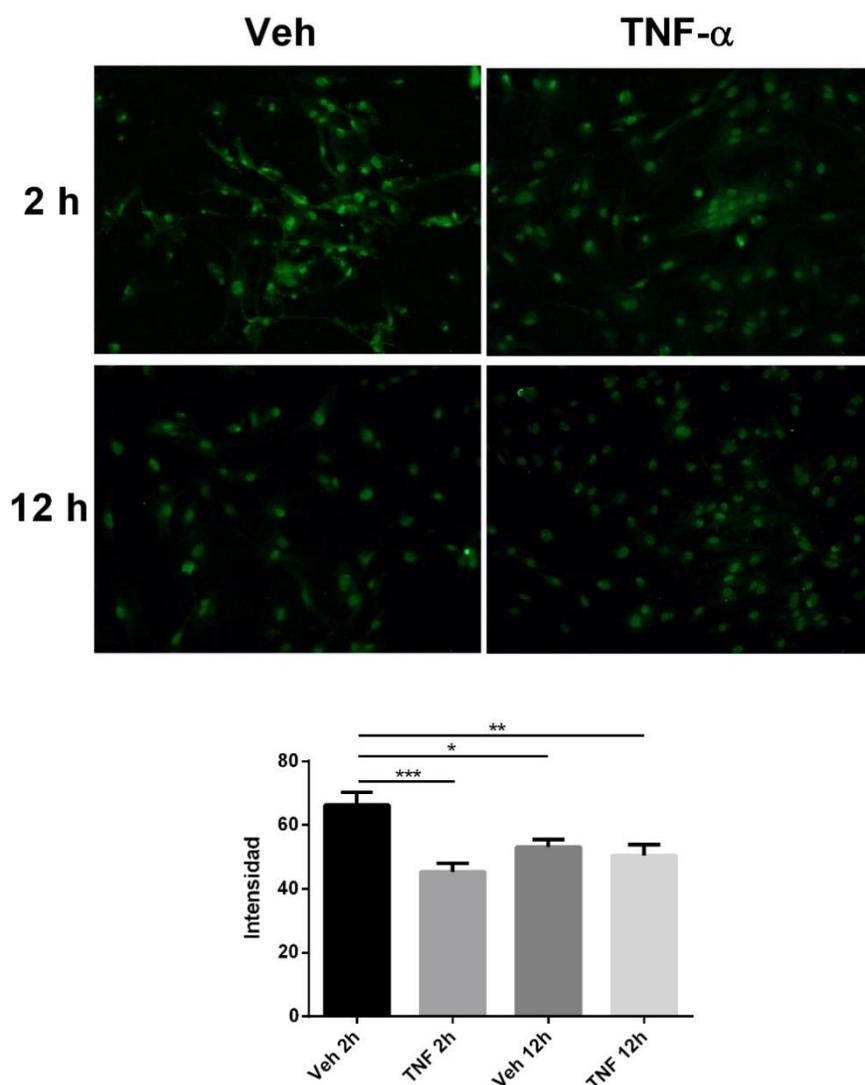
En resumen, TNF- $\alpha$  aplicado sobre cultivos de astrocitos de NSQ induce retrasos en la fase de los ritmos de expresión de PER2, si la citoquina se aplica cerca del mínimo de este ritmo, e incrementos en la amplitud, si se la aplica cerca del pico del ritmo.



**Figura 2.3.4 (Página anterior) Efectos de TNF- $\alpha$  aplicado a CT 14 sobre el reloj molecular de astrocitos de NSQ. A)** Niveles de expresión de Per2<sup>luc</sup> en dos cultivos primarios de astrocitos, que recibieron TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) o vehículo a CT 14. **B)** Efectos de TNF- $\alpha$  a CT 14 en la fase de los ritmos de expresión de Per2<sup>luc</sup> de astrocitos de NSQ. **C)** Efectos de TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) sobre la amplitud de los ritmos de expresión de Per2<sup>luc</sup> en astrocitos de NSQ. **D)** Efecto de la dosis de TNF- $\alpha$  sobre la amplitud de los ritmos de expresión de Per2<sup>luc</sup> en astrocitos de NSQ.

#### 2.3.2.2 Efectos agudos sobre la expresión de PER2 en cultivos Wt.

El modelo de ratones Per2<sup>luc</sup> es de amplia utilización en el campo de la cronobiología, y las medidas de bioluminiscencia correlacionan fuertemente con la expresión de Luciferasa y de PER2 (Foley et al. 2011). No obstante esto, quisimos corroborar que el tratamiento con TNF- $\alpha$  fuese capaz de alterar los niveles de PER2 en cultivos de ratones Wt. Para ello tratamos cultivos primarios de astrocitos Wt con TNF- $\alpha$  20 ng/ml 2 y 12 horas luego de sincronizar los cultivos con un cambio de medio. De esta manera, el tratamiento se realizó en diferentes fases del ritmo circadiano de expresión de PER2. El tratamiento con TNF- $\alpha$  produjo una reducción en los niveles de PER2 en los cultivos tratados 2 horas luego de la sincronización pero no en los tratados 12 horas post sincronización (ANOVA seguido de la prueba de Holm-Sidak,  $p < 0,001$  para vehículo 2 hs contra TNF- $\alpha$  2 hs,  $p < 0,05$  para vehículo 2 hs contra vehículo 12 hs,  $p < 0,01$  para vehículo 2 hs contra vehículo 12 hs,  $p > 0,05$  para los demás contrastes,  $n = 3$  cultivos para cada condición, **Figura 2.3.5**).

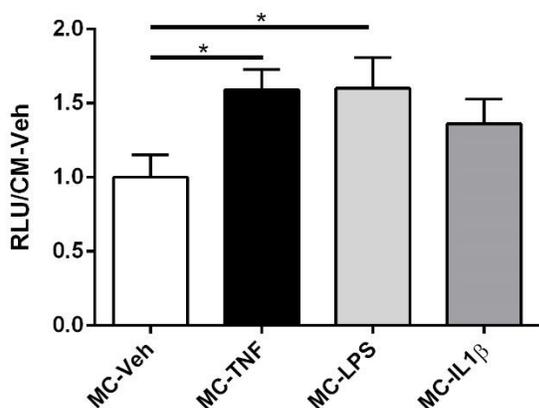


**Figura 2.3.5 Efectos de TNF- $\alpha$  sobre la expresión de PER2 en astrocytos Wt.** Panel superior: fotografías de inmunofluorescencia de PER2 en cultivos de astrocytos de NSQ tratados con TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) o vehículo 2 o 12 horas luego de sincronización por cambio de medio. Panel inferior: cuantificación de la intensidad de la señal de PER2 en cada una de las condiciones

### 2.3.3 Efectos de los medios condicionados de astrocytos en la expresión de Per1.

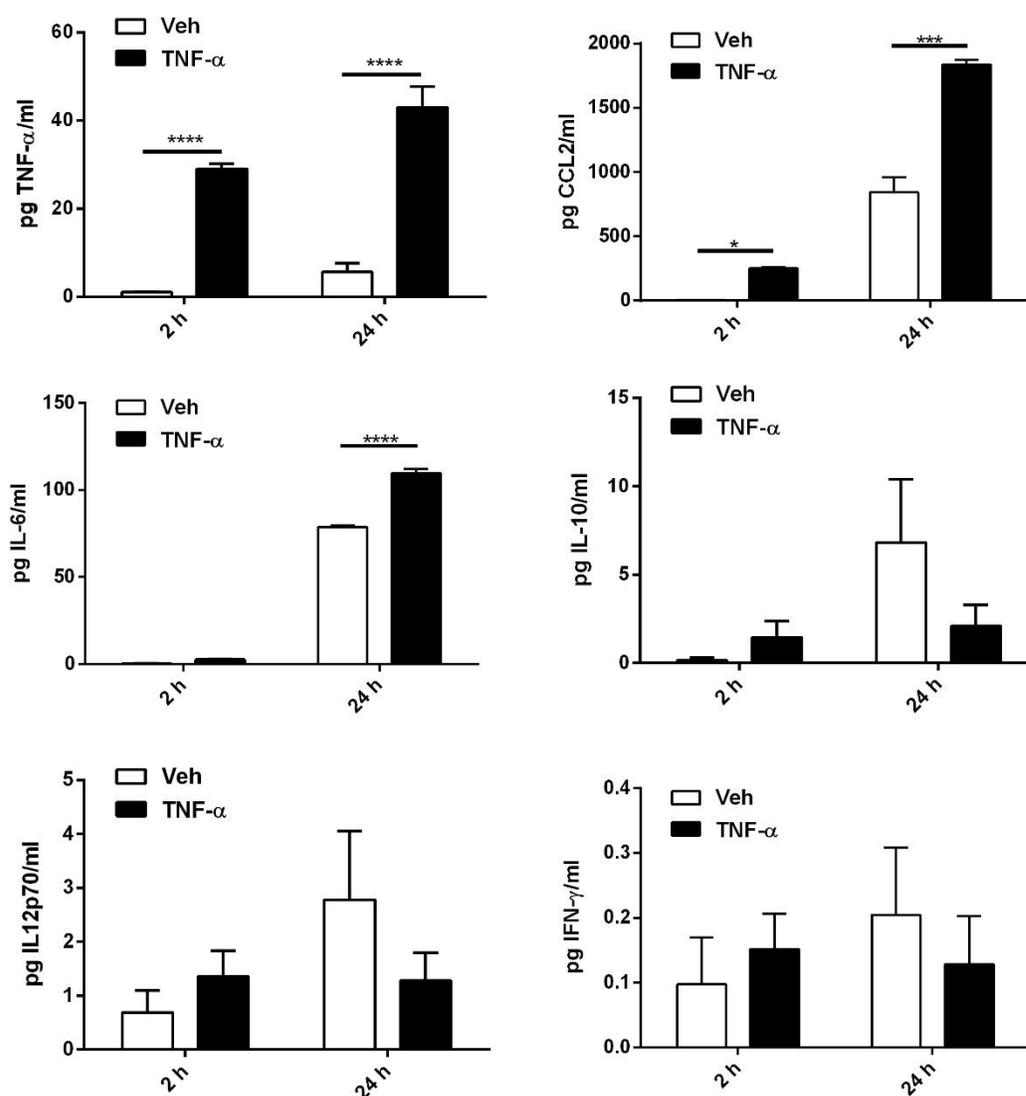
Una vez caracterizados los efectos de un estímulo inmune sobre el reloj circadiano de los astrocytos, nos preguntamos si, en respuesta a tales estímulos, estas células son también capaces de modular la expresión de genes reloj en otros tipos celulares. Nuestra primera aproximación fue un modelo en el que se utilizaron medios condicionados de astrocytos tratados transitoriamente con estímulos inmunes (LPS, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , ver **Figura 2.2.1** y **2.2.2**) y los medios condicionados recolectados de estos cultivos se utilizaron para tratar (también transitoriamente) células NIH 3T3 transfectadas con una construcción hPer1-luc.

Encontramos que los medios condicionados provenientes de cultivos de astrocitos tratados transitoriamente con LPS y TNF- $\alpha$  produjeron un incremento en la actividad del promotor de Per1, medida 24 horas luego del tratamiento (ANOVA seguido por la prueba de Dunnett con MC-Veh como control,  $p < 0,05$  para MC-TNF y MC-LPS,  $p > 0,05$  para MC-IL-1 $\beta$ ,  $n = 8$ , **Figura 2.3.6**).



**Figura 2.3.6** El tratamiento transitorio con MC-LPS y MC-TNF induce la expresión de Per1 en fibroblastos transfectados con una construcción hPer1-luc.

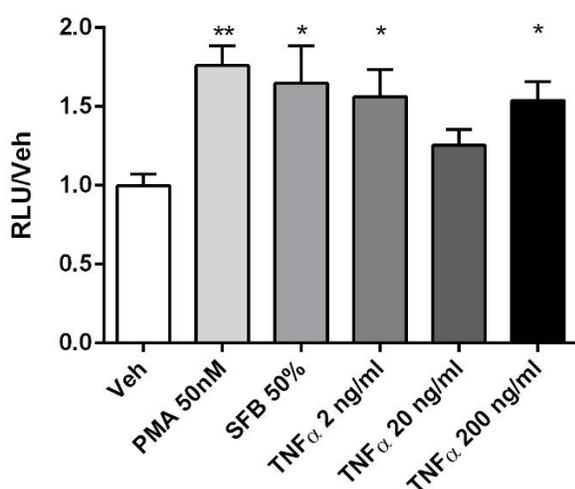
A continuación nos preguntamos qué factores son secretados por los astrocitos, en respuesta a un estímulo inmune. Dado que la citoquina TNF- $\alpha$ , actuando a nivel de los NSQ se encuentra involucrada en la respuesta del reloj a una activación inmune periférica, y que, en el mismo modelo, las dosis utilizadas de LPS son demasiado bajas para atravesar la BHE, decidimos continuar nuestros experimentos con TNF- $\alpha$  como estímulo inicial. Encontramos que el tratamiento con 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  indujo la secreción de CCL2, IL-6 y del mismo TNF- $\alpha$ , pero no de IFN- $\gamma$ , IL-12p70 o IL-10 (ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak, para cada molécula;  $n = 5$ ; **Figura 2.3.7**). Cabe destacar que la medición en medios condicionados a tiempo cero (inmediatamente luego de retirar el tratamiento) no arrojó valores detectables de TNF- $\alpha$ , ni de ninguna de las demás moléculas.



**Figura 2.3.7 Citoquinas y Quimioquinas secretados por astrocitos de NSQ en respuesta a TNF- $\alpha$ .** El tratamiento transitorio (2 hs) con TNF- $\alpha$  (20 ng/l) induce la liberación de CCL2, IL-6 y TNF- $\alpha$  en cultivos de astrocitos de NSQ.

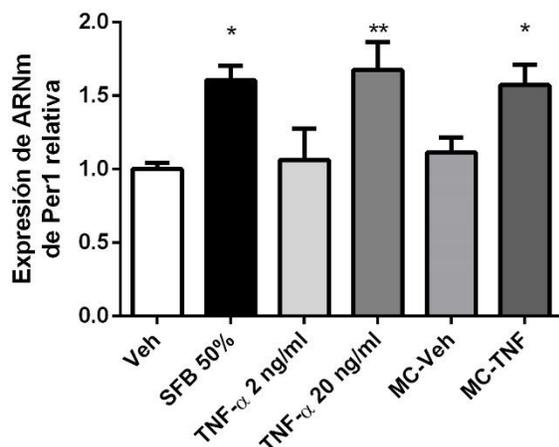
Dado que la secreción de TNF- $\alpha$  se ve incrementada en los medios condicionados de astrocitos tratados con estímulos inmunes y que, tal como se mencionó antes, esta citoquina media la respuesta del reloj circadiano a la activación inmune, nos preguntamos si el TNF- $\alpha$  presente en los medios condicionados podría ser el responsable de la inducción de Per1 en las células NIH-3T3. Como primera aproximación, testamos si un

tratamiento con TNF- $\alpha$  era capaz de inducir la expresión de Per1 en la línea NIH-3T3. Se utilizaron PMA y un shock de suero 50% como controles positivos, ya que se ha descrito que son capaces de sincronizar la expresión de Per1 en fibroblastos (Balsalobre et al. 2000). Encontramos que el tratamiento con 2 y 200 ng/ml de TNF- $\alpha$  indujo la actividad de hPer1-luc en células NIH-3T3 (ANOVA seguido por la prueba de Dunnett con vehículo como control negativo,  $p < 0,01$  para PMA,  $p < 0,05$  para shock de suero, TNF- $\alpha$  2 ng/ml y TNF- $\alpha$  200 ng/ml,  $n = 4$ , **Figura 2.3.8**).



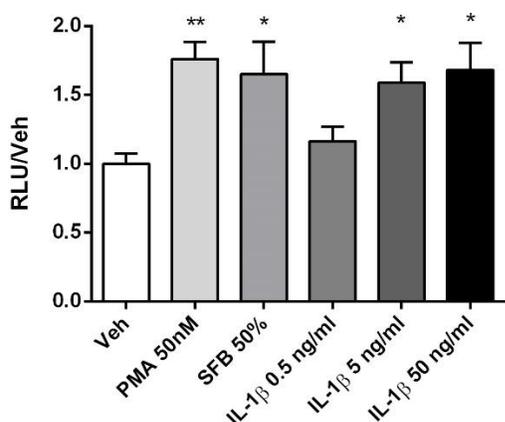
**Figura 2.3.8** El tratamiento transitorio con TNF- $\alpha$  es capaz de inducir la expresión de hPer1-luc en fibroblastos. PMA 50 nM y Shock de suero: controles positivos.

Además, los efectos de TNF- $\alpha$  y de los medios condicionados de astrocitos tratados con TNF- $\alpha$  sobre la actividad hPer1-luc se observaron también en los niveles de ARNm de Per1, medidos por *real time* PCR, confirmando la validez del reportero hPer1-luc (ANOVA seguido por la prueba de Dunnett con vehículo como control,  $p < 0,05$  para shock de suero,  $p < 0,01$  para TNF- $\alpha$  20 ng/ml,  $p < 0,05$  para MC-TNF,  $n = 4$ , **Figura 2.3.9**)



**Figura 2.3.9** Los efectos de TNF- $\alpha$  y MC-TNF sobre la expresión de hPer1-luc también se observan en los niveles de ARNm de Per1 endógeno en los fibroblastos de la línea NIH-3T3.

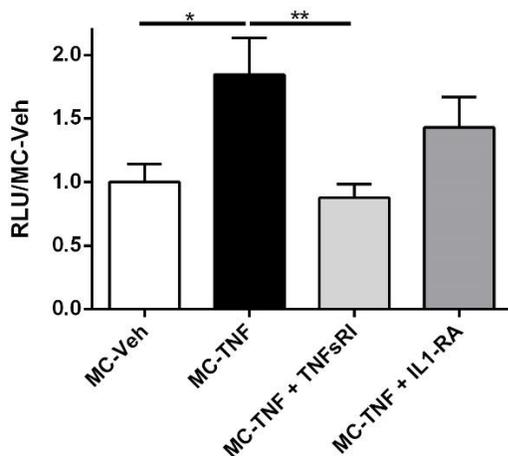
La administración de IL-1 $\beta$  sobre la región de los NSQ es capaz de inducir cambios de fase en los ritmos de actividad locomotora. Por este motivo, deseamos testear si IL-1 $\beta$  era capaz de inducir cambios en la actividad hPer1-luc de las células NIH-3T3. El tratamiento con IL-1 $\beta$  5 y 50 ng/ml produjo un incremento en la actividad HPer1-luc en fibroblastos, sugiriendo que esta citoquina es capaz de alterar la expresión de genes reloj, al menos in vitro (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett con vehículo como control negativo,  $p < 0,01$  para PMA,  $p < 0,05$  para shock de suero, IL-1 $\beta$  5 ng/ml e IL-1 $\beta$  50 ng/ml,  $n = 7-8$ , Figura 2.3.10).



**Figura 2.3.10** El tratamiento transitorio con IL-1 $\beta$  induce la expresión de hPer1-luc en fibroblastos NIH-3T3. PMA 50 nM y Shock de suero: controles positivos.

Finalmente quisimos corroborar qué factor era el responsable de la inducción de hPer1-luc producida por los medios condicionados de astrocitos tratados con TNF- $\alpha$ . Para ello, repetimos el tratamiento de las células NIH-3T3 con MC-TNF, con el agregado de un

antagonista del receptor de IL-1 $\beta$  (0,1  $\mu$ g/ml), o de TNFsR (0,1  $\mu$ g/ml, de modo de evitar la acción de TNF- $\alpha$ ). La adición de TNFsR, pero no de IL-1R, fue capaz de inhibir la activación de hPer1-luc por MC-TNF en las células NIH-3T3 (ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p < 0,05$  para MC-Veh contra MC-TNF,  $p < 0,05$  para MC-TNF contra MC-TNF + TNFsR,  $p > 0,05$  para el resto de los contrastes,  $n = 14$ , **Figura 2.3.11**).



**Figura 2.3.11** El bloqueo de la acción de TNF- $\alpha$  (pero no de IL-1 $\beta$ ) evita la inducción de hPer1-luc producida por MC-TNF en fibroblastos NIH-3T3.

En resumen, estos resultados demuestran que, en respuesta a estímulos inmunes transitorios, los astrocitos de NSQ son capaces de secretar moléculas que alteren la expresión de Per1. Además, las evidencias apuntan fuertemente a TNF- $\alpha$  como un factor secretado necesario para producir tal efecto.

### 2.3.4 Efectos de los medios condicionados de astrocitos en el reloj molecular de los NSQ.

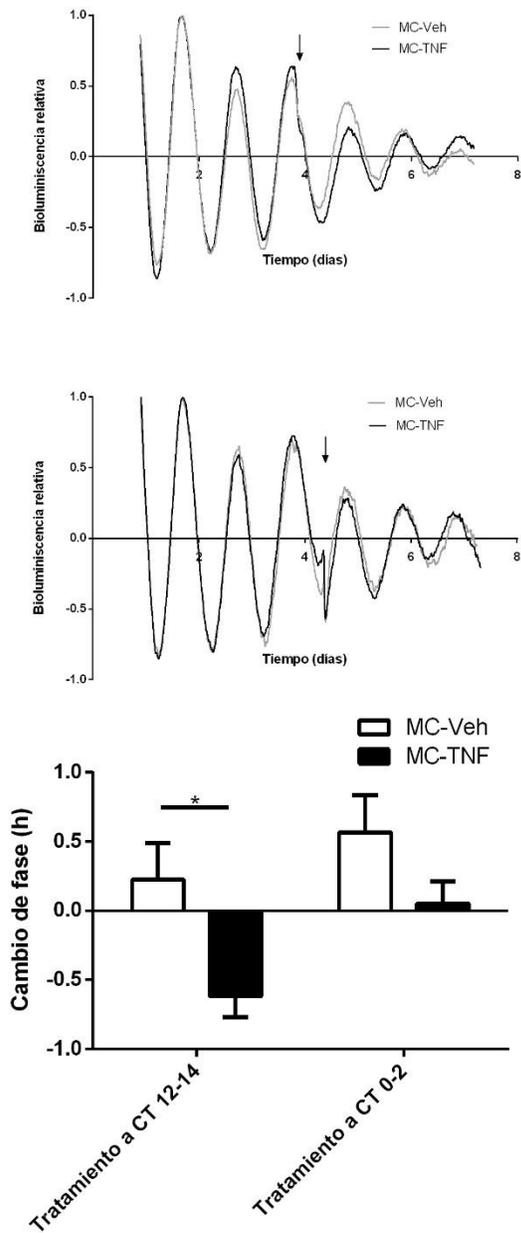
A continuación, quisimos extender los resultados de la sección 2.3.3 a un modelo que involucrase el oscilador circadiano principal. Para eso, trabajamos con cultivos de explantos de NSQ de ratones Per2<sup>luc</sup>, y tratamos estas rodajas con los medios condicionados de astrocitos tratados con TNF- $\alpha$ . A su vez, dado que la sensibilidad del reloj circadiano a estímulos inmunes depende de la fase en la que se encuentra el reloj en el momento del tratamiento (Marpegán et al. 2005), analizamos si los efectos de los

medios condicionados sobre el reloj de los NSQ también respondía a estas características.

El tratamiento de rodajas de NSQ de ratones  $Per2^{luc}$  produjo retrasos de fase en los ritmos de expresión de  $PER2^{luc}$ , cuando el tratamiento se aplicó 1 – 2 horas después del pico (CT 13-14;  $-37,2 \pm 9$  minutos para CM-TNF y  $13,2 \pm 15,6$  minutos para CM-Veh) pero no cuando el tratamiento se aplicó 1 – 2 horas después del valle (CT 1-2;  $3 \pm 9,6$  minutos para CM-TNF y  $33,6 \pm 16,2$  minutos para CM-Veh; ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni,  $p < 0,05$  para MC-TNF contra CM-Veh a CT 13-14,  $p > 0,05$  para MC-TNF contra MC-Veh a CT 1-2,  $n = 6-8$ , **Figura 2.3.12**)

Al analizar cambios en la amplitud de las oscilaciones de  $PER2^{luc}$  no se encontraron diferencias entre las rodajas tratadas con MC-Veh y MC-TNF en cada tiempo. Sin embargo, el tratamiento con MC-TNF a CT 1-2 produjo un menor decaimiento de la amplitud, comparada con lo que ocurre a CT 13-14 para ambos tratamientos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p < 0,05$  para MC-TNF a CT 1-2 contra MC-TNF a CT 13-14,  $p < 0,01$  para MC-TNF a CT 1-2 contra MC-Veh a CT 13-14,  $p > 0,05$  para las demás comparaciones,  $n = 6-8$ , **Figura 2.3.12**)

Estos resultados demuestran que el oscilador circadiano principal es sensible a factores liberados por los astrocitos de NSQ en respuesta a estímulos inmunes.



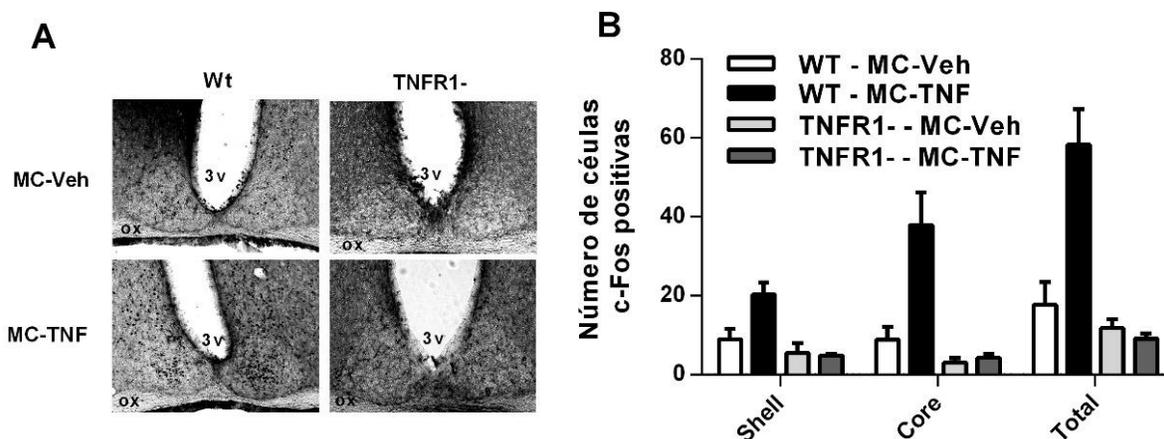
**Figura 2.3.12** La aplicación de MC-TNF a CT 12-14 (pero no a CT 0-2) sobre rebanadas de NSQ de ratones Per2luc produce retrasos en la fase del reloj molecular de los NSQ. Paneles superiores: trazas de bioluminiscencia de rebanadas de NSQ tratadas con MC-TNF a CT 12-14 o a CT 0-2. Panel inferior: cambios de fase inducidos por dichos tratamientos y amplitud relativa posterior a cada tratamiento.

### 2.3.5 Efectos de los medios condicionados de astrocitos sobre el reloj circadiano *in vivo*.

Finalmente, quisimos analizar si los efectos encontrados en los cultivos de explantos de NSQ podían reproducirse en un modelo *in vivo*.

Para ello, realizamos inyecciones icv de medios condicionados de astrocitos, dirigidas al fondo del tercer ventrículo, por sobre los NSQ. Las administraciones se realizaron a CT 15, durante la noche subjetiva temprana, horario en el que se ha descrito que el reloj es sensible a estímulos proinflamatorios (Marpegán et al. 2005), y en el que, tal como describimos en la sección anterior, el reloj molecular de los NSQ puede ser alterado por los medios condicionados.

Primeramente, analizamos si los medios condicionados eran capaces de activar las células de los NSQ in vivo. Para ello, analizamos la expresión de una proteína de inducción temprana, c-Fos, que se considera un marcador de activación celular y su inducción se correlaciona con los cambios de fase del reloj (Wollnik et al. 1995; Amy et al. 2000). Encontramos que la administración icv de medios condicionados de astrocitos tratados con TNF- $\alpha$  en animales Wt produjo un incremento en el número de células c-Fos positivas tanto en la región ventro-lateral (*core*) como en la dorso-ventral (*shell*) de los NSQ. Analizando los posibles mediadores de tal efecto, encontramos que la inducción de c-Fos en los NSQ, producida por los medios condicionados, no ocurrió cuando los mismos se administraron en animales mutantes para el receptor de TNF- $\alpha$  tipo I (región *core*: ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p < 0,001$  para MC-TNF en ratones Wt contra MC-Veh en Wt,  $p < 0,0001$  para MC-TNF en Wt contra MC-TNF en ratones Tnfr1-KO,  $p < 0,001$  para CM-TNF en Wt contra CM-Veh en Tnfr1-KO,  $p > 0,05$  para los demás contrastes; región *shell*: ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p < 0,05$  para MC-TNF en ratones Wt contra MC-Veh en Wt,  $p < 0,01$  para MC-TNF en Wt contra MC-TNF en ratones Tnfr1-KO,  $p < 0,01$  para CM-TNF en Wt contra CM-Veh en Tnfr1-KO,  $p > 0,05$  para los demás contrastes; área total de los NSQ: ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p < 0,01$  para MC-TNF en ratones Wt contra MC-Veh en Wt,  $p < 0,001$  para MC-TNF en Wt contra MC-TNF en ratones Tnfr1-KO,  $p < 0,01$  para CM-TNF en Wt contra CM-Veh en Tnfr1-KO,  $p > 0,05$  para los demás contrastes;  $n = 3-4$ ; **Figura 2.3.13**).

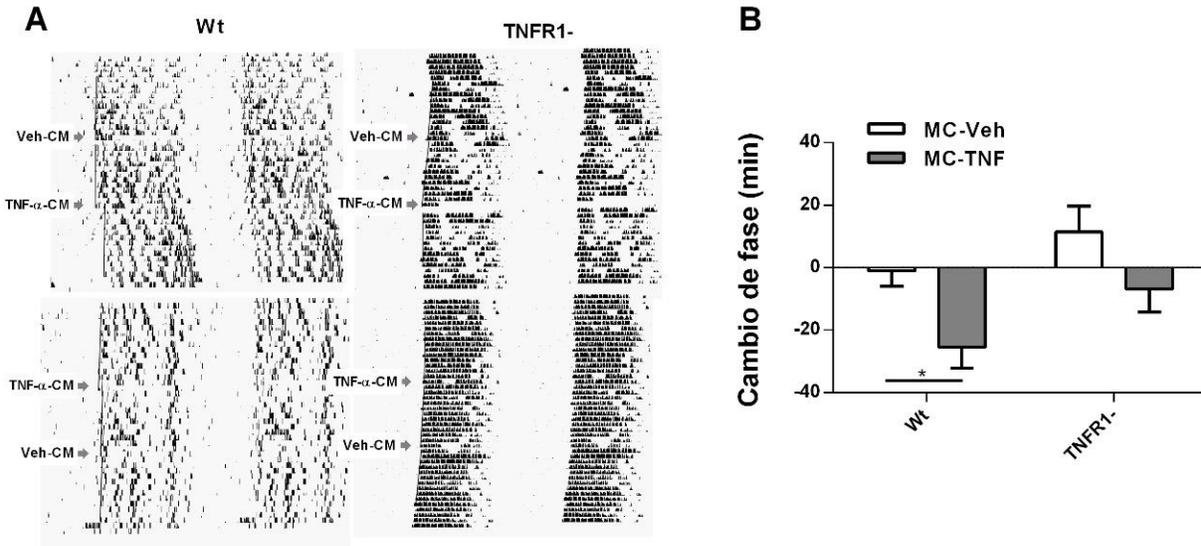


**Figura 2.3.13 La administración icv de MC-TNF produce la activación de los NSQ.**

**A)** Fotografías de cortes conteniendo los NSQ, marcados contra la proteína c-Fos, de ratones Wt y TNFR1<sup>-/-</sup> que recibieron una administración icv de MC-TNF a CT 15. **B)** MC-TNF induce la expresión de c-Fos en los NSQ de ratones Wt, pero no en ratones TNFR1<sup>-/-</sup>.

Por último, analizamos si una salida comportamental del reloj biológico, los ritmos de actividad locomotora en rueda, eran afectados por la administración icv de medios condicionados de astrocitos. Nuevamente, el horario de administración fue durante la noche subjetiva temprana, a CT 15.

Encontramos que, en ratones Wt, los medios condicionados de astrocitos tratados con TNF- $\alpha$  produjeron un retraso de fase limitado aunque significativo en los ritmos de actividad locomotora ( $- 25,3 \pm 7$  minutos en animales que recibieron MC-TNF, contra  $- 6,7 \pm 7$  minutos para el control MC-Veh). Nuevamente, analizamos el efecto de este tratamiento en ratones Tnfr1-KO, y el mismo no indujo cambios de fase significativos ( $- 6,8 \pm 7$  minutos para MC-TNF y  $11,4 \pm 8$  para MC-Veh), sugiriendo que el TNF- $\alpha$  presente en los medios condicionados MC-TNF también media los efectos de los mismos sobre el reloj circadiano (ANOVA de dos vías, seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Sidak,  $p < 0,01$  para CM-TNF contra CM-Veh en ratones Wt,  $p > 0,05$  para CM-TNF contra CM-Veh en ratones Tnfr1-KO,  $n = 8-9$ , **Figura 2.3.14**)



**Figura 2.3.14** La administración Icv de MC-TNF induce cambios en la fase de los ritmos de actividad locomotora. **A)** Actogramas representativos de animales que recibieron MC-TNF o MC-Veh en forma Icv a CT 15. **B)** La administración Icv de MC-TNF induce retrasos de fase en los ritmos de actividad locomotora de ratones Wt, pero no en animales TNFR1<sup>-/-</sup>.



## 2.4 Discusión.

Los resultados del presente capítulo apuntan a los astrocitos como mediadores en la respuesta del reloj circadiano a estímulos proinflamatorios. Numerosos trabajos previos han demostrado que el oscilador circadiano central es sensible a una variedad de estímulos inmunes. En particular, la citoquina TNF- $\alpha$  (ya sea sola, o en combinación con otros agentes proinflamatorios) es capaz de modular el funcionamiento de los NSQ *in vivo* (Sadki et al. 2007; Leone et al. 2012) o de alterar las propiedades electrofisiológicas de los núcleos *in vitro* (Kwak et al. 2008; Nygård et al. 2009). En el SNC, los astrocitos son capaces de mediar la inmunidad innata, expresando y respondiendo a una gran variedad de factores proinflamatorios (ver revisión en: Tian et al. 2012). A su vez, hay un gran número de trabajos que apuntan a un rol importante de estas células en la fisiología de los ritmos circadianos. Es por esto que nos abocamos a caracterizar la respuesta de los astrocitos de los NSQ a factores proinflamatorios, y su capacidad de modular los ritmos circadianos como consecuencia de la activación inmune.

Los astrocitos de los NSQ se activan en respuesta a diversos factores proinflamatorios, incluyendo LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , tanto *in vitro*, evidenciado por la activación de la vía de NF $\kappa$ B (Leone et al. 2006), como *in vivo*, evidenciado por el incremento en los niveles de GFAP (Deng et al. 2010). En este trabajo extendimos estos hallazgos, analizando los efectos de la citoquina TNF- $\alpha$  en el reloj molecular de los astrocitos de NSQ. Encontramos efectos tanto en la fase como en la amplitud en los ritmos de expresión de PER2::luc, así como un descenso en la intensidad de la señal de PER2 en astrocitos Wt en respuesta al tratamiento con TNF- $\alpha$ . Se ha descrito previamente que TNF- $\alpha$  es capaz de alterar la expresión de genes reloj en fibroblastos de ratón, en un mecanismo Ca<sup>2+</sup>-dependiente, que involucra la vía de p38 (Cavadini et al. 2007; Petrzilka et al. 2009). En estas células, el tratamiento con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  produjo un incremento transitorio de Per1 y Per2, observado 1 hora luego del tratamiento, y una posterior atenuación de los ritmos de expresión a tiempos más largos. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos encontrado un efecto opuesto tanto en la expresión aguda, como en la amplitud de los ritmos de PER2, en cultivos de astrocitos. Estas diferencias pueden deberse a la activación de diferentes vías de señalización intracelulares en cada tipo celular, que depende de diversos factores, tales como el estado metabólico y la presencia

de distintas proteínas adaptadoras (McCoy & Tansey 2008), en diferencias metodológicas en la aplicación de la droga (ver más adelante) o en la salida de estudio (ARNm de *Per2* en los trabajos de Cavadini y Petrzilka, proteína PER2 o PER2::luc en nuestro trabajo). Asimismo, existen al menos dos posibles causas para explicar un incremento en la amplitud de los ritmos en cultivos *Per2<sup>luc</sup>*: una mayor coherencia entre las fases de oscilación de células individuales o un incremento en la amplitud de la oscilación en cada una de las células (o incluso una combinación de ambos efectos). Si bien esta pregunta está más allá de los alcances de esta tesis, experimentos en los que se puedan seguir los niveles de expresión de PER2::luc en células individuales, durante períodos prolongados de tiempo (por ejemplo mediante el uso de una cámara CCD acoplada a un microscopio) podrían proveer evidencias interesantes en este sentido.

Los efectos de TNF- $\alpha$ , tanto sobre los ritmos de expresión de PER2::luc como sobre los niveles de la PER2 en astrocitos Wt, dependieron de la fase o momento de tratamiento. Encontramos un incremento en la amplitud de los ritmos de PER2::luc sólo cuando el TNF- $\alpha$  se aplicó dos horas luego del pico de PER2, pero no cuando el tratamiento se aplicó en el mínimo o valle del ritmo. Por otro lado, los efectos sobre la fase de los ritmos de PER2::luc fueron más importantes cuando el tratamiento se aplicó en el valle del ritmo de PER2::luc, comparado con lo que ocurre con los tratamientos 2 horas luego del pico. Esta relación inversa entre la magnitud de los cambios de fase y la amplitud de los ritmos PER2::luc ya se ha descrito previamente para cultivos de fibroblastos sensibles a la luz, en respuesta a estímulos fóticos (Pulivarthy et al. 2007). La respuesta diferencial en distintas fases del reloj podría deberse a una variación circadiana en la expresión o actividad de diversos componentes de la vía que se activa en respuesta a TNF- $\alpha$  y que, en última instancia afectan la expresión de genes reloj. Luego de la unión al receptor (Tnfr), TNF- $\alpha$  es capaz de activar diversas vías de señalización, incluyendo las vías de p38 y MAPK, y la del factor de transcripción NF $\kappa$ B. Se ha descrito que el receptor Tnfr1 posee variaciones diarias, a nivel transcripcional, en los NSQ de ratón (Paladino et al. 2014; Sadki et al. 2007). Además un análisis transcriptómico ha hallado variaciones circadianas en los niveles de diversos componentes de la vía de NF $\kappa$ B y de p38 en macrófagos peritoneales (Keller et al. 2009). De este modo, si bien las variaciones anteriormente descritas no se han estudiado en

astrocitos de NSQ, podemos hipotetizar que la vía de señalización de TNF- $\alpha$  puede activar distintas vías, en distintas magnitudes dependiendo del momento del tratamiento.

Los astrocitos son importantes para la regulación de funciones cerebrales complejas, tales como la homeostasis de sueño (Halassa et al. 2009), la memoria (Suzuki et al. 2011; Han et al. 2012), el control de la alimentación y de la respiración (Kim et al. 2014; Gourine et al. 2010), y los ritmos circadianos (Jackson 2011). Dado que los NSQ son sensibles a estímulos inmunes y que los astrocitos son capaces de responder a factores proinflamatorios y de modular la fisiología neuronal, hipotetizamos que los astrocitos de los NSQ podrían actuar como mediadores en la comunicación entre el sistema inmune y el reloj circadiano. Primeramente, hemos mostrado que, en respuesta a un estímulo inmune transitorio, los astrocitos de NSQ son capaces de modular la expresión del gen *Per1* en fibroblastos murinos, a través de la liberación de TNF- $\alpha$ . Los efectos de TNF- $\alpha$  sobre la línea NIH-3T3 ya han sido estudiados previamente por el grupo de Adriano Fontana y colaboradores (Petrzilka et al. 2009; Cavadini et al. 2007). Tal como mencionamos previamente, en estos trabajos se encontró un incremento transitorio en los niveles de ARNm de *Per1* dentro de la primera hora de tratamiento, seguido de un decaimiento en la amplitud que duró por unas 36 horas. Nuestros resultados en células NIH-3T3 tratadas con TNF- $\alpha$ , o con MC-TNF (que posee TNF- $\alpha$ ) mostraron un incremento en la actividad promotora en los niveles de ARNm de *Per1*, pero fueron medidos 24 horas luego del tratamiento. La principal diferencia entre ambos diseños experimentales radica en la duración del tratamiento. En los trabajos del grupo de Fontana, las células fueron primero sincronizadas con un shock de suero y luego se les agregó la citoquina, que permaneció en el medio de allí en adelante. Por otro lado, nuestro enfoque fue realizar un tratamiento transitorio con TNF- $\alpha$  o MC-TNF, seguido de un cambio de medio, y un análisis de los efectos del tratamiento 24 horas más tarde. El cambio de medio de cultivo es capaz de sincronizar fibroblastos en cultivo (Welsh et al. 2004), y TNF- $\alpha$  es capaz de inducir la expresión de *Per1* a tiempos cortos de tratamiento en estas células (Petrzilka et al. 2009). Este último efecto podría reforzar la sincronización producida luego por el cambio de medio (en nuestro diseño) y, por lo tanto, ser el responsable de la inducción de los niveles de *Per1* luego del tratamiento con TNF- $\alpha$ .

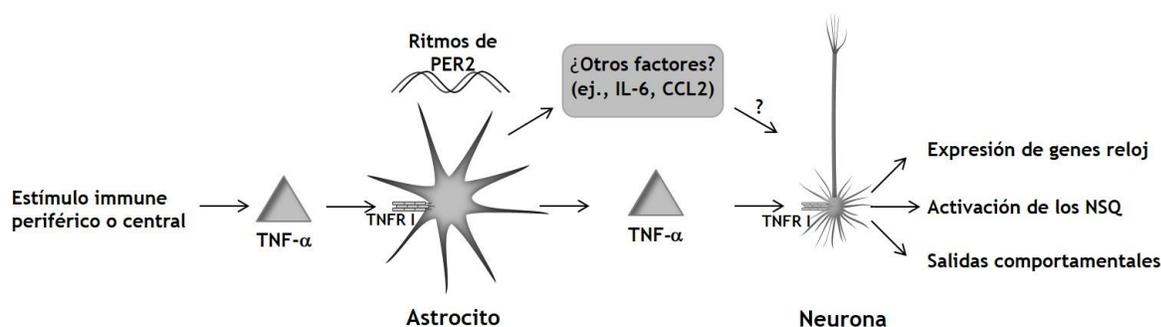
Además de la inducción de Per1 en fibroblastos, los factores secretados por los astrocitos en respuesta a un estímulo inmune transitorio también produjeron importantes efectos en el oscilador circadiano principal. Los medios condicionados de astrocitos tratados con TNF- $\alpha$  indujeron retrasos en la fase de los ritmos expresión de PER2::luc en los NSQ, sólo cuando el tratamiento se realizó 1-2 horas luego del máximo de PER2, pero no en otra fase. En los NSQ *in vivo*, el pico de expresión de PER2 ocurre alrededor de CT 12 (Field et al. 2000), lo que, extrapolado a los cultivos organotípicos indicaría que los tratamientos en las primeras horas luego del pico de PER2 se asemejan a tratamientos en la noche subjetiva temprana, al menos en términos de la fase de PER2. Es importante destacar que, considerando lo anterior, la sensibilidad de los explantos de NSQ a estímulos inmunes coincide también con la ventana temporal en la que el sistema circadiano es sensible a un desafío inmune *in vivo* (Marpegan et al. 2011). Con respecto a posibles cambios en la amplitud, no se encontró un efecto para MC-TNF, comparando con el control aplicado en el mismo momento del ritmo. Si bien los efectos variaron al comparar entre MC-TNF aplicado a CT 1-2 y a CT 12-13, esto probablemente refleje una respuesta general del reloj al mecanismo de aplicación utilizado, ya que, como dijimos, los efectos encontrados para MC-Veh fueron los mismos que para MC-TNF en cada horario.

La administración Icv de medios condicionados de astrocitos tratados con TNF- $\alpha$  durante la noche subjetiva temprana (CT 15) indujo también la activación de las células de los NSQ, así como retrasos en la fase de los ritmos de actividad locomotora. Tal como se describió previamente, los NSQ se encuentran anatómicamente subdivididos en dos áreas, basándonos en la expresión de diferentes neuropéptidos: 1) una región ventrolateral (*core*), que recibe aferencias del TRH y que es rica en células VIP y GRP positivas; y 2) la región dorso-medial (*shell*), con células AVP positivas (Antle & Silver 2005; Abrahamson & Moore 2001). Trabajos previos han descripto la inducción de c-Fos en los NSQ en respuesta a estímulos inmunes. En uno de los trabajos (Sadki et al. 2007) se estudiaron los niveles de c-Fos 3 horas luego de una administración Icv (en los ventrículos laterales) de un cocktail conteniendo IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , hallando un incremento en los animales tratados, principalmente en la región *core* de los NSQ. Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio (Paladino et al. 2014) mostraron que, en respuesta a

una dosis intraperitoneal de LPS, la región core muestra una inducción temprana (30 minutos post administración), y luego se incrementa el número de células c-Fos positivas en la región shell (90 minutos post tratamiento). Por otro lado, los resultados de esta tesis mostraron que la administración Icv, dirigida al fondo del tercer ventrículo, de MC-TNF produjo un incremento en el número de células c-Fos positivas en ambas regiones de los NSQ. De esta manera, queda claro que la activación de los NSQ está mediada por diferentes caminos neuroanatómicos, dependiendo de la naturaleza y ruta de administración de los estímulos proinflamatorios. Resulta de interés para futuras investigaciones determinar qué consecuencias tiene la activación de una u otra (o ambas) regiones de los NSQ, en términos de la respuesta del reloj al estímulo inmune.

El análisis de los medios condicionados mostró que, entre otras moléculas, el tratamiento transitorio con TNF- $\alpha$  inducía su propia secreción en astrocitos de los NSQ. Además, el bloqueo de la acción de esta citoquina mediante el agregado de TNFR atenuó los efectos de los medios condicionados sobre la expresión de Per1 en fibroblastos y las respuestas in vivo a los MC-TNF administrados Icv estuvieron ausentes en animales mutantes para el receptor Tnfr1. Estos resultados apuntan a que el TNF- $\alpha$  secretado por los astrocitos es, al menos parcialmente, responsable de los efectos de los medios condicionados sobre el reloj biológico (aunque no podemos descartar la posibilidad de que se induzca la secreción de TNF- $\alpha$  en células NIH-3T3 o en el SNC en respuesta a otras moléculas presentes en los MC-TNF). Más allá de su rol en situaciones de inflamación patológicas, el TNF- $\alpha$  posee también un rol en el SNC sano (Santello & Volterra 2012). Incluso se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  proveniente de astrocitos no estimulados es capaz de influenciar la comunicación sináptica (Beattie et al. 2002); asimismo, en un interesante trabajo del grupo de Maiken Nedergaard se trasplantaron precursores de astrocitos humanos a ratones inmunodeficientes, los cuales produjeron mejoras en el aprendizaje y en la transmisión sináptica, dependientes de la producción de TNF- $\alpha$  por los astrocitos humanos (Han et al. 2013). Estos trabajos evidencian que las células gliales pueden modular el funcionamiento neuronal a través de esta citoquina. Tanto los ritmos de PER2::*luc* en explantos de NSQ, como los ritmos de actividad locomotora están mediados por la actividad neuronal (Deery et al. 2009; Schwartz et al. 1987), lo que implica que los efectos de los MC-TNF en ambas variables involucran

cambios en el funcionamiento neuronal. De esta manera, los resultados de este trabajo implican que los astrocitos de los NSQ podrían funcionar como mediadores de la modulación del sistema circadiano por estímulos inmunes, posiblemente funcionando como amplificadores de la señal de TNF- $\alpha$ , que, en última instancia induciría cambios en la expresión de genes reloj en las neuronas de los NSQ y en la fase del oscilador circadiano (**Figura 2.4.1**).



**Figura 2.4.1** Posible rol de los astrocitos en la interacción inmune-circadiana. Los astrocitos de los NSQ son activados por el TNF- $\alpha$  liberado ante una activación inmune. En respuesta a esto se producen alteraciones en su reloj molecular y la liberación de factores que llevan a la modulación de los ritmos circadianos.

Además de la liberación de TNF- $\alpha$ , los astrocitos podrían contar con otros mecanismos que fuesen responsables de los efectos de los medios condicionados sobre el reloj circadiano. La expresión del receptor de IL-1 $\beta$  (IL-1R1) presenta una variación diaria en los NSQ, y la administración *icv* de esta citoquina, sobre los NSQ, produce cambios en la fase de los ritmos de actividad locomotora (Beynon & Coogan 2010; Leone et al. 2012). En el presente trabajo encontramos que la expresión de Per1 en fibroblastos es inducida por IL-1 $\beta$ . Sin embargo, el agregado de un antagonista de IL-1 no atenuó los efectos de MC-TNF en la expresión de Per1 estas células. Estos resultados sugieren que, si bien el reloj molecular de los fibroblastos es sensible a IL-1 $\beta$ , y la misma es capaz de inducir cambios de fase *in vivo*, esta citoquina no se encuentra involucrada en la alteración del

reloj molecular producida por los medios condicionados de astrocitos. Del mismo modo, los cambios de fase producidos por LPS intraperitoneal no dependen de la acción de IL-1 $\beta$  a nivel de los NSQ, sugiriendo que ese efecto, como el producido por los MC-TNF se deben a una vía que no involucra a IL-1 $\beta$ .

Es interesante notar que la liberación tanto de CCL2 como de IL-6 se incrementó en los cultivos de astrocitos de NSQ luego del tratamiento transitorio con TNF- $\alpha$ . Existe una variación diaria en los niveles de IL-6 en el hipotálamo de rata (Guan et al. 2005) y la administración de esta citoquina lcv altera el sueño NREM (Hogan et al. 2003). Además, la actividad del promotor de hPer1 se incrementa en respuesta a IL-6 en células de hepatoma humanas (Motzkus et al. 2002), aunque esta citoquina no altera la expresión de genes reloj en fibroblastos de ratón (Cavadini et al. 2007). Asimismo, y como se analizará en profundidad en el **Capítulo 2**, la quimioquina CCL2 posee un papel importante en la respuesta del reloj circadiano a estímulos inmunes. Es decir que, además de TNF- $\alpha$ , tanto IL-6 como CCL2 (y otras moléculas no identificadas en nuestro análisis de los medios condicionados) podrían estar involucradas en los efectos de los MC-TNF sobre el reloj circadiano. Como ya mencionamos, en el **Capítulo 2** caracterizamos el rol de CCL2 en la interacción entre el sistema inmune y el circadiano, mientras que la participación precisa de IL-6 en la misma será sujeto de futuras investigaciones.

Tal como se describió en la introducción de este capítulo el rol de la glía en el sistema circadiano ha comenzado a estudiarse en profundidad recién en los últimos años. Hasta ahora el estudio sobre la modulación circadiana en mecanismos de comunicación de los astrocitos hacia otras células se ha enfocado en los gliotransmisores glutamato y ATP (Beaulé et al. 2009; Marpegan et al. 2011; Womac et al. 2009; Burkeen et al. 2011) y se ha postulado que estas moléculas podrían actuar tanto en las neuronas de los NSQ como en los mismos astrocitos. Los resultados de esta tesis muestran por primera vez que un factor secretado por los astrocitos (TNF- $\alpha$ ) es capaz de modular el funcionamiento del reloj circadiano, tanto a nivel molecular como comportamental. Resulta de interés proponer como futuras investigaciones si existe un rol fisiológico en la gliotransmisión mediada por TNF- $\alpha$  sobre el reloj circadiano, y si, a su vez, la misma está modulada rítmicamente.

Finalmente, cabe resaltar que en numerosas patologías que involucran un estado de activación inflamatoria, y que pueden conllevar a alteraciones de los ritmos circadianos, se observa la activación de células gliales (Lundkvist et al. 2002; Bentivoglio & Kristensson 2007; Peng et al. 1994; Keita et al. 1997; Amrouni et al. 2010; Hunter et al. 1992). Nuestros resultados sugieren que luego de una activación dada por una señal proinflamatoria producida por una situación patológica, los astrocitos de los NSQ pudieran actuar como un intermediario celular importante que medie los efectos de la enfermedad sobre los ritmos circadianos.

En resumen, nuestros hallazgos resultan de interés en nuestro campo de estudio ya que contribuyen tanto a la caracterización de los mecanismos por los cuales el sistema inmune es capaz de modular los ritmos biológicos, así como también al entendimiento del rol de los astrocitos en el reloj circadiano.

**Bibliografía Capítulo 1**

- Abrahamson, E.E. & Moore, R.Y., 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain research*, 916(1-2), pp.172–91.
- Amrouni, D. et al., 2010. Cerebral and peripheral changes occurring in nitric oxide (NO) synthesis in a rat model of sleeping sickness: identification of brain iNOS expressing cells. *PloS one*, 5(2), p.e9211.
- Amy, S.P., Chari, R. & Bult, a., 2000. Fos in the Suprachiasmatic Nucleus of House Mouse Lines That Reveal a Different Phase-Delay Response to the Same Light Pulse. *Journal of Biological Rhythms*, 15(2), pp.95–102.
- Antle, M.C. & Silver, R., 2005. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends in neurosciences*, 28(3), pp.145–51.
- Araque, A. et al., 2014. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*, 81(4), pp.728–39.
- Balsalobre, a, Marcacci, L. & Schibler, U., 2000. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Current biology*, 10(20), pp.1291–4.
- Beattie, E.C. et al., 2002. Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563), pp.2282–5.
- Beaulé, C. et al., 2009. Circadian modulation of gene expression, but not glutamate uptake, in mouse and rat cortical astrocytes. *PloS one*, 4(10), p.e7476.
- Bentivoglio, M. & Kristensson, K., 2007. Neural-immune interactions in disorders of sleep-wakefulness organization. *Trends in neurosciences*, 30(12), pp.645–652.
- Beynon, A.L. & Coogan, A.N., 2010. Diurnal, age, and immune regulation of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 type 1 receptor in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Chronobiology international*, 27(8), pp.1546–63.
- Burkeen, J.F. et al., 2011. Mitochondrial calcium signaling mediates rhythmic extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(23), pp.8432–40.

- Cavadini, G. et al., 2007. TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), pp.12843–8.
- Davidson, A.J. et al., 2009. Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. *The European journal of neuroscience*, 29(1), pp.171–80.
- Deery, M.J. et al., 2009. Proteomic analysis reveals the role of synaptic vesicle cycling in sustaining the suprachiasmatic circadian clock. *Current biology : CB*, 19(23), pp.2031–6.
- Deng, X.-H. et al., 2010. Glial transcripts and immune-challenged glia in the suprachiasmatic nucleus of young and aged mice. *Chronobiology international*, 27(4), pp.742–67.
- Farina, C., Aloisi, F. & Meinl, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*, 28(3), pp.138–45.
- Field, M.D. et al., 2000. Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*, 25(2), pp.437–47.
- Foley, N.C. et al., 2011. Characterization of orderly spatiotemporal patterns of clock gene activation in mammalian suprachiasmatic nucleus. *The European journal of neuroscience*, 33(10), pp.1851–65.
- Girardet, C. et al., 2010. Neuroglial and synaptic rearrangements associated with photic entrainment of the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus. *The European journal of neuroscience*, 32(12), pp.2133–42.
- Gourine, A. V et al., 2010. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science (New York, N. Y.)*, 329(5991), pp.571–5.
- Guan, Z. et al., 2005. Interleukin-6 levels fluctuate with the light-dark cycle in the brain and peripheral tissues in rats. *Brain, behavior, and immunity*, 19(6), pp.526–9.
- Halassa, M.M. et al., 2009. Astrocytic Modulation of Sleep Homeostasis and Cognitive Consequences of Sleep Loss. *Neuron*, 61(2), pp.213–219.
- Halassa, M.M., Fellin, T. & Haydon, P.G., 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in molecular medicine*, 13(2), pp.54–63.
- Han, J. et al., 2012. Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, 148(5), pp.1039–50.

- Han, X. et al., 2013. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell stem cell*, 12(3), pp.342–53.
- Hogan, D. et al., 2003. Interleukin-6 alters sleep of rats. *Journal of neuroimmunology*, 137(1-2), pp.59–66.
- Hunter, C.A. et al., 1992. Astrocyte activation correlates with cytokine production in central nervous system of *Trypanosoma brucei brucei*-infected mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 67(5), pp.635–42.
- Jackson, F.R., 2011. Glial Cell Modulation of Circadian Rhythms. *Glia*, 59(9), pp.1341–1350.
- Keita, M. et al., 1997. *Trypanosoma brucei brucei*: a long-term model of human African trypanosomiasis in mice, meningo-encephalitis, astrocytosis, and neurological disorders. *Experimental parasitology*, 85(2), pp.183–92.
- Keller, M. et al., 2009. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), pp.21407–12.
- Kettenmann, H. et al., 2011. Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, pp.461–553.
- Kim, J.G. et al., 2014. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nature neuroscience*, 17(7), pp.908–10.
- Kwak, Y. et al., 2008. Interferon- $\gamma$  Alters Electrical Activity and Clock Gene Expression in Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *Journal of Biological Rhythms*, (2), pp.150–159.
- Lavialle, M. & Servièrè, J., 1993. Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport*, 4(11), pp.1243–6.
- Leone, J., Marpegan, L. & Bekinschtein, A., 2006. Suprachiasmatic Astrocytes as an Interface for Immune-Circadian Signalling. *Journal of Neuroscience Research*, 1527(April), pp.1521–1527.
- Leone, M.J. et al., 2012. Role of proinflammatory cytokines on lipopolysaccharide-induced phase shifts in locomotor activity circadian rhythm. *Chronobiology international*, 29(6), pp.715–23.
- Lundkvist, G.B., Hill, R.H. & Kristensson, K., 2002. Disruption of Circadian Rhythms in Synaptic Activity of the Suprachiasmatic Nuclei by African Trypanosomes and Cytokines. *Neurobiology of Disease*, 11(1), pp.20–27.

- Marpegan, L. et al., 2011. Circadian regulation of ATP release in astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(23), pp.8342–50.
- Marpegán, L. et al., 2005. Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *Journal of neuroimmunology*, 160(1-2), pp.102–9.
- McCoy, M.K. & Tansey, M.G., 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation*, 5, p.45.
- Motzkus, D., Albrecht, U. & Maronde, E., 2002. The human PER1 gene is inducible by interleukin-6. *Journal of molecular neuroscience*, 18(1-2), pp.105–9.
- Nygård, M. et al., 2009. Rapid nitric oxide-dependent effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on suprachiasmatic nuclei neuronal activity. *Neuroreport*, 20(2), pp.213–7.
- Paladino, N. et al., 2014. Modulation of mammalian circadian rhythms by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Chronobiology international*, 31(5), pp.668–79.
- Pannasch, U. et al., 2011. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), pp.8467–72.
- Peng, Z.C., Kristensson, K. & Bentivoglio, M., 1994. Dysregulation of photic induction of Fos-related protein in the biological clock during experimental trypanosomiasis. *Neuroscience letters*, 182(1), pp.104–6.
- Petrzilka, S. et al., 2009. Clock gene modulation by TNF- $\alpha$  depends on calcium and p38 MAP kinase signaling. *Journal of biological rhythms*, 24(4), pp.283–94.
- Prolo, L.M., Takahashi, J.S. & Herzog, E.D., 2005. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 25(2), pp.404–8.
- Pulivarthy, S.R. et al., 2007. Reciprocity between phase shifts and amplitude changes in the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), pp.20356–61.
- Ransohoff, R.M. & Perry, V.H., 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology*, 27, pp.119–45.
- Reichenbach, A. & Wolburg, H., 2004. Astrocytes and ependymal glia. In H. Kettenmann & B. R. Ransom, eds. *Neuroglia*.
- Richardson, W.D. et al., 2011. Review NG2-glia as Multipotent Neural Stem Cells : Fact or Fantasy ? *Neuron*, 70(4), pp.661–673.

- Sadki, A. et al., 2007. Suppressors, receptors and effects of cytokines on the aging mouse biological clock. *Neurobiology of aging*, 28(2), pp.296–305.
- Santello, M. & Volterra, A., 2012. TNF $\alpha$  in synaptic function: switching gears. *Trends in neurosciences*.
- Santos, J. et al., 2005. Circadian variation in GFAP immunoreactivity in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biological Rhythm Research*, 36(1-2), pp.141–150.
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y. & Frenette, P.S., 2013. Circadian control of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 13(3), pp.190–8.
- Schwartz, W.J., Grosst, R.A. & Mortont, M.T., 1987. The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Neurobiology*, 84(March), pp.1694–1698.
- Suzuki, A. et al., 2011. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 144(5), pp.810–23.
- Tian, L. et al., 2012. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), p.155.
- Trotter, J., Karram, K. & Nishiyama, A., 2010. NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain research reviews*, 63(1-2), pp.72–82.
- Volterra, A., Liaudet, N. & Savtchouk, I., 2014. Astrocyte Ca(2+) signalling: an unexpected complexity. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(5), pp.327–35.
- Welsh, D.K. et al., 2004. Bioluminescence Imaging of Individual Fibroblasts Reveals Persistent, Independently Phased Circadian Rhythms of Clock Gene Expression. *Current*, 14, pp.2289–2295.
- Wollnik, F. et al., 1995. Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *The European journal of neuroscience*, 7(3), pp.388–93.
- Womac, A.D. et al., 2009. Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes. *The European journal of neuroscience*, 30(5), pp.869–76.
- Yoo, S.-H. et al., 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), pp.5339–46.



## Capítulo 2

“El rol de CCL2 en la respuesta del reloj circadiano a la activación inmune”



### 3.1 Introducción.

#### 3.1.1 La quimioquina CCL2 en el SNC.

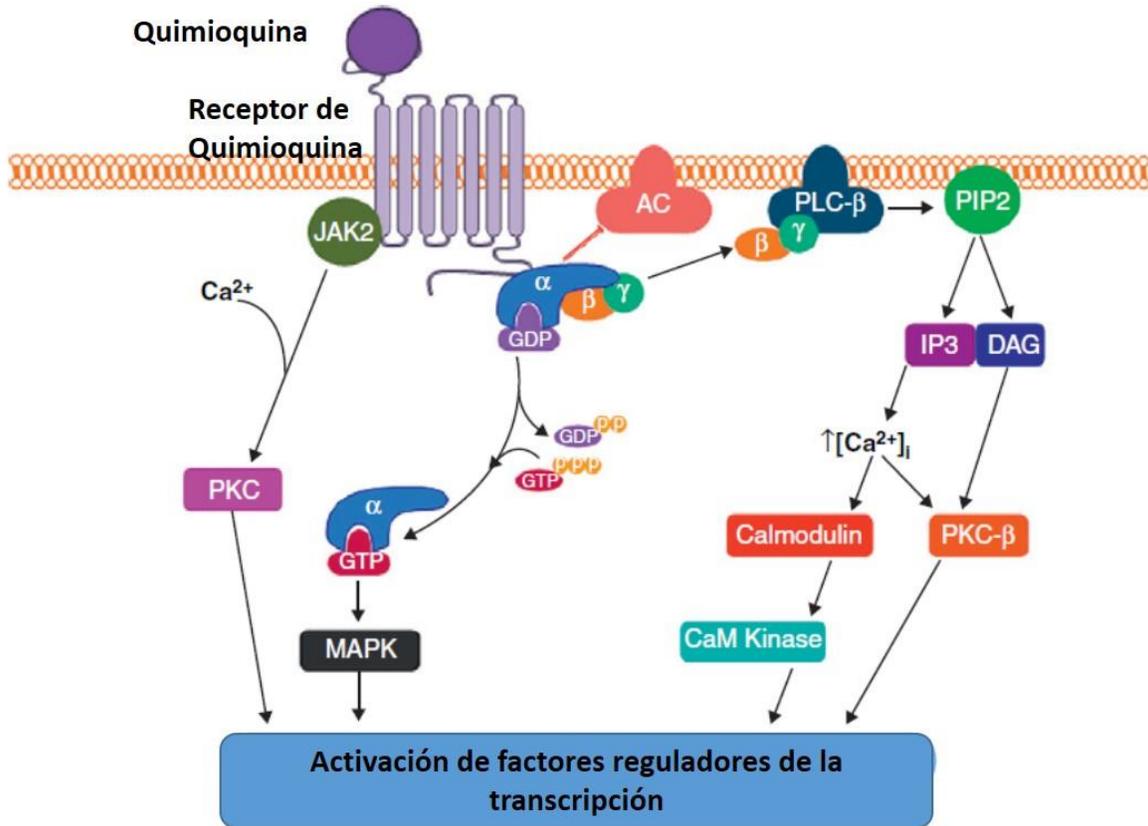
Como se describió en la introducción general, la inmunidad en el SNC está mediada por actores celulares particulares (microglía y astrocitos) pero, en general, utiliza moléculas y mecanismos similares a los que se dan en periferia.

Además de esto, ante determinadas situaciones proinflamatorias, las células del SNC envían señales que llevan al reclutamiento de células desde la periferia al SNC. Las moléculas responsables de la migración de las células inmunes a diferentes tejidos se conocen con el nombre de quimioquinas, categoría que engloba a más de 50 proteínas de bajo peso molecular (6 – 10 kDa).

Las quimioquinas se clasifican en base a sus características estructurales:

- Quimioquinas CXC: poseen un residuo aminoacídico separando dos cisteínas conservadas. Son principalmente quimiotácticas para neutrófilos.
- Quimioquinas CCL: poseen dos cisteínas adyacentes y son quimioattractantes para monocitos y linfocitos.

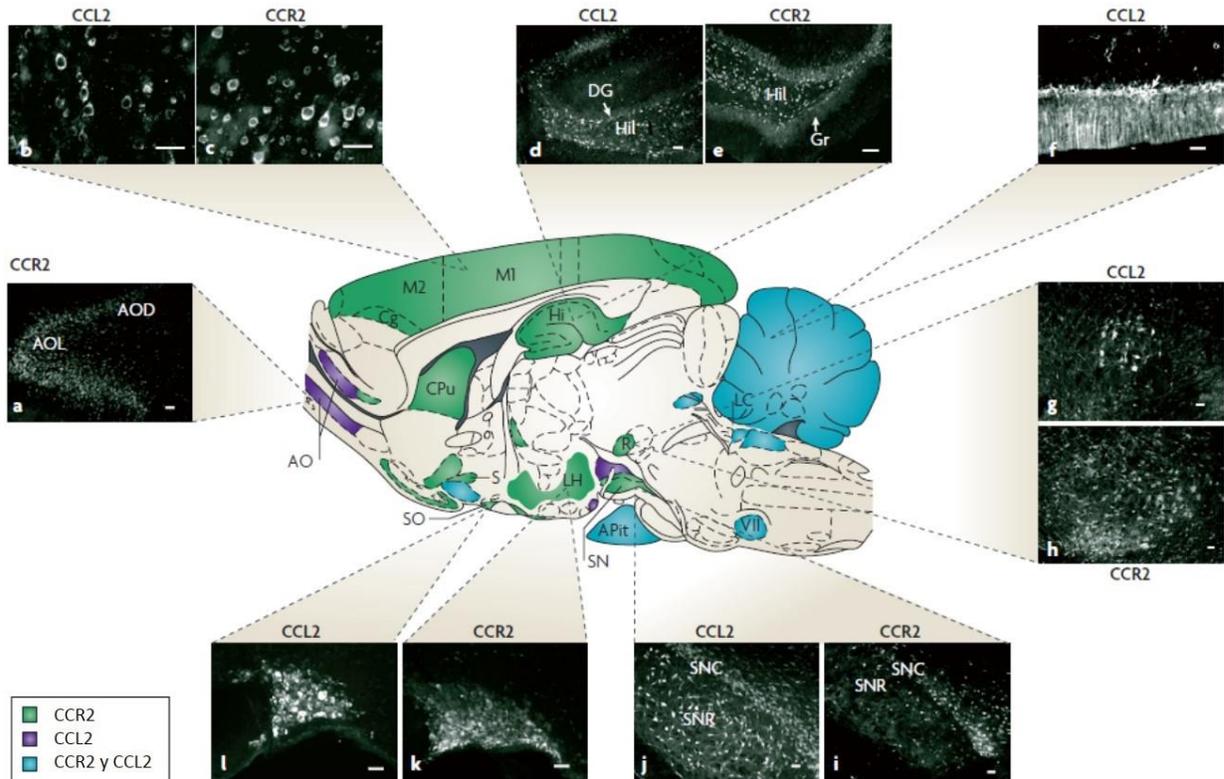
Algunas quimioquinas son consideradas proinflamatorias ya que se inducen durante la respuesta inmune con el fin de reclutar células inmunes al sitio de infección, mientras que otras se consideran homeostáticas y están involucradas en el control de la migración celular durante procesos normales de mantenimiento tisular o de desarrollo. Estas moléculas actúan sobre receptores asociados a proteína G, presentes en diferentes células, donde activan cascadas de señalización que pueden involucrar las vías de proteína quinasa C (PKC), de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK), Calcio-Calmodulina-quinasas y PKC- $\beta$  (**Figura 3.1.1**).



**Figura 3.1.1 Vías de señalización activadas por las quimioquinas.** Las quimioquinas activan receptores de membrana asociados a proteína G. Esta activación promueve la señalización a través de las vías de PKC, MAPK's y Ca-Calmodulina. JAK2: Janus Kinase 2;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  subunidades de la proteína G; AC: Adenilato ciclasa; PLC- $\beta$ : Fosfolipasa C; IP3: Inositol-3-Fosfato; DAG: Diacil Glicerol. (Adaptado de: Old & Malcangio 2012)

Un quiebre en el estudio de las quimioquinas ocurrió cuando algunos receptores para estas moléculas fueron descritos como partícipes de la neuroinflamación. De esta manera se abrieron ciertos interrogantes, tales como ¿estas pequeñas proteínas, se encuentran en el cerebro? ¿en qué células? ¿se originan en la periferia o pueden ser sintetizadas por células del SNC? ¿las quimioquinas a nivel del SNC, poseen otras funciones más allá de la respuesta inmune?

Hay evidencias que han llevado a postular que las quimioquinas podrían tener un rol en el funcionamiento normal del SNC. Una de ellas es la quimioquina CCL2, la cual se encuentra además involucrada en contextos inflamatorios dentro del SNC. Los análisis de la expresión de esta molécula en el cerebro no inflamado han demostrado que la misma y su receptor se expresan en una variedad de estructuras (**Figura 3.1.2**; Rostène et al. 2007). Mediante inmunomarcación se ha determinado que las células que expresan principalmente CCL2 y CCR2 son las células gliales (microglía y astrocitos), aunque también se ha encontrado señal de CCL2 diversas poblaciones neuronales (Semple et al. 2010).



**Figura 3.1.2 (Página anterior). Expresión de CCL2 y CCR2 en el cerebro de mamíferos.** (Modificado de Rostène et al. 2007). Se ha descrito la expresión de CCL2 (indicadas en verde en el diagrama) en la corteza, el giro dentado del hipocampo, el cerebelo, sustancia nigra y núcleos supraópticos, entre otros. A su vez, la expresión de CCR2 (en púrpura en el diagrama) se ha descrito en el bulbo olfatorio, el área hipotalámica lateral, el hipocampo, el cerebelo y la pituitaria, entre otros. Finalmente, se muestran regiones en las que se ha descrito la expresión de ambas moléculas (en azul en el diagrama) **a**. Expresión en el área anterior del bulbo olfatorio (AO) lateral (AOL) y dorsal (AOD). **b, c**. Expresión en el giro cingulado (Cg), en el área motora primaria (M1), y área motora secundaria (M2) de la corteza. **d, e**. Expresión en el giro dentado (DG) y en el hilus (Hi) del hipocampo (Hi). **f**. Expresión en células de Purkinje del cerebelo. **g, h**. Expresión en el núcleo rojo (R). **i, j**. Expresión en la sustancia nigra (SN), pars compacta (SNC) y en la sustancia nigra pars reticulata (SNR). **k, l**. Expresión en el núcleo supraóptico (SO) y en el área lateral hipotalámica (LH).

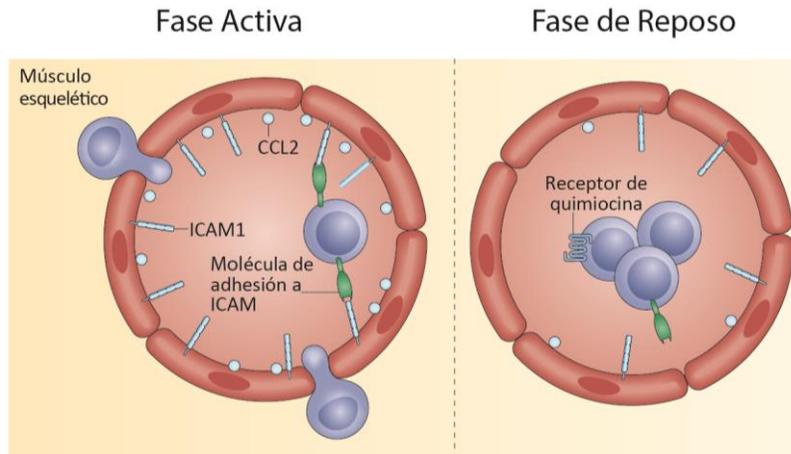
El solapamiento en algunas regiones entre la quimioquina y su receptor sugieren además que CCL2 podría estar involucrada en la comunicación neuronal. Esto ha sido estudiado en la región del hipocampo, donde la aplicación de CCL2 llevó a aumentos en los disparos de neuronas CA1, en conjunto con un incremento en las corrientes excitatorias post-sinápticas, actuando probablemente sobre receptores CCR2 (Zhou et al. 2011). Además, CCL2 es capaz de activar la vías de señalización por calcio intracelular en células de Purkinje del cerebelo (van Gassen et al. 2005) y la liberación de dopamina y la actividad motora (Guyon et al. 2009). Por otro lado, la localización de CCL2 en terminales nerviosos de la pituitaria posterior ha llevado a postular también un posible rol como neurohormona, siendo secretada al torrente sanguíneo. Estos resultados, y otros similares encontrados en otras quimioquinas, han llevado a proponer a estas moléculas como un sistema de comunicación dentro del SNC (Adler et al. 2005).

### 3.1.2 Ritmos circadianos en CCL2.

En los últimos años han surgido una serie de trabajos en los que se demuestra un robusto control circadiano sobre la expresión de CCL2 en la periferia, con gran relevancia en los ritmos en la respuesta inmune.

El primer trabajo describiendo un control del reloj biológico sobre CCL2 fue realizado en 2007 por Hayashi y colaboradores (Hayashi et al. 2007). Los investigadores estudiaron variaciones circadianas en las funciones de los macrófagos peritoneales, encontrando que la expresión de CCL2 por estas células variaba fuertemente a lo largo del día. Esta expresión estaba modulada por BMAL1, actuando probablemente a través del factor de transcripción NF $\kappa$ B. La inducción de CCL2 circulante en respuesta a la activación inmune (mediante la administración de LPS) también varía según el horario, con una mayor inducción durante la transición luz – oscuridad (Marpegan et al. 2009; Gibbs et al. 2012). En un trabajo reciente también se describió un control circadiano sobre la expresión de CCL2 mediado por un doble control vía ROR $\alpha$  (que la induce) y REV-ERB $\alpha$  (que la inhibe). A su vez, los autores describieron que estos genes reloj modulan la migración y la adhesión de los macrófagos, a través de su control de la expresión de CCL2 (Sato et al. 2014).

La relevancia de CCL2 a la hora de regular el reclutamiento de células inmunes a diferentes tejidos ha sido también estudiada recientemente. La extravasación de leucocitos hacia el tejido muscular sigue un ritmo circadiano, correlacionado con la expresión rítmica de CCL2 en células endoteliales, ausente en ratones *Ccr2*<sup>-/-</sup> (**Figura 3.1.3**; Scheiermann et al. 2012). También el reclutamiento de monocitos tipo Ly6C<sup>hi</sup> a sitios de inflamación, así como los niveles circulantes de los mismos siguen un fuerte ritmo diario, que está mediado por la oscilación de CCL2 en los sitios de reclutamiento, y por el receptor CCR2 (Nguyen et al. 2013).



**Figura 3.1.3. CCL2 en los ritmos de tráfico de células inmunes.** En el músculo esquelético, el reclutamiento de leucocitos desde la sangre se encuentra favorecido durante la fase activa, debido a los mayores niveles de expresión de CCL2 y de ICAM por parte de las células endoteliales, y de las moléculas de adhesión en los leucocitos. Durante la fase de reposo, los menores niveles de ambos tipos de moléculas producen un menor reclutamiento de esas células al tejido. (Modificado de: Scheiermann et al. 2013, ICAM: intercellular adhesion molecule).

De esta manera, existen evidencias que sugieren fuertemente que la ritmicidad de la respuesta inmune, en cuanto a lo que se refiere al reclutamiento de células inmunes al sitio de infección, podría estar mediada por un control circadiano sobre la expresión de CCR2.

### 3.1.3 CCL2 en astrocitos

Como ya mencionamos, en el SNC la expresión de CCL2 se da tanto en neuronas como en células gliales, aunque estas últimas son las que presentan mayores niveles de activación para esta molécula. La inducción de CCL2 en astrocitos se ha observado en diversos modelos de patologías del SNC incluyendo Alzheimer

(Severini et al. 2014; Smits et al. 2002), esclerosis múltiple (Tanuma et al. 2006), trauma cerebral (Khoroshi et al. 2008) e isquemia (Tei et al. 2013; Kuboyama et al. 2011). Además, la inducción de CCL2 en los astrocitos puede darse también en respuesta a estímulos inmunes periféricos, particularmente ante la administración de LPS intravenoso (Gourmala et al. 1997).

Respecto al control circadiano de la expresión de CCL2 en los astrocitos, se ha demostrado que, en astrocitos de la espina dorsal, la expresión de CCL2 está controlada negativamente por Per1, a través de la inhibición de la vía de p38, JNK y NFkB (Sugimoto et al. 2014).

Finalmente, resulta también de interés que la sobreexpresión de CCL2 en astrocitos altere las respuestas postsinápticas en el hipocampo y afecte mecanismos de plasticidad sináptica (un fenómeno ya descrito para el TNF- $\alpha$  de origen glial) (Nelson et al. 2011). Esto sugiere que la quimioquina, secretada por células de la glía puede ser capaz de modular mecanismos neuronales.

### **3.1.4 CCL2 en la respuesta circadiana a estímulos inmunes.**

Resumiendo los antecedentes presentados anteriormente, existen fuertes evidencias de que la quimioquina CCL2 es capaz de regular el funcionamiento neuronal. Además, esta quimioquina es secretada por astrocitos en respuesta a la administración de LPS periférico, y el CCL2 de origen astrocítico es capaz de modular la transmisión sináptica. Cabe recordar, finalmente, que al analizar las moléculas secretadas por los astrocitos de los NSQ, en respuesta a un estímulo transitorio con TNF- $\alpha$ , encontramos que CCL2 se inducía muy fuertemente en estos cultivos.

De esta manera, resulta interesante evaluar si CCL2 tiene algún rol en la respuesta del reloj circadiano a la activación inmune periférica por LPS, así como el rol de esta molécula en la respuesta de los astrocitos de NSQ a estímulos proinflamatorios.



## **Hipótesis y Objetivos del capítulo 2.**

### **Hipótesis particular del Capítulo 2.**

Considerando las evidencias presentadas respecto al rol de CCL2 en el SNC, y su papel en la respuesta a la activación inmune, surge como hipótesis que:

*La quimioquina CCL2 participa en la respuesta del reloj biológico a estímulos inmunes.*

### **Hipótesis específicas:**

- Los NSQ expresan el receptor CCR2, activado por CCL2
- CCL2 se induce en los NSQ en respuesta a un estímulo inmune periférico.
- La acción de CCL2 a nivel de los NSQ es importante en la respuesta a estímulos inmunes periféricos.

### **Objetivo general:**

*Determinar el rol de CCL2 en la respuesta del reloj circadiano a estímulos inmunes.*

**Objetivos específicos:**

- Determinar si la quimioquina CCL2 y su receptor CCR2 se expresan en los NSQ de ratón y evaluar si hay variaciones diarias en sus niveles.
- Analizar la expresión de CCL2 y CCR2 en respuesta a la administración intraperitoneal de LPS.
- Determinar la importancia de la acción de CCL2 a nivel de los NSQ en los cambios de fase inducidos por la administración de LPS intraperitoneal.

## **3.2. Materiales y Métodos.**

### **3.2.1 Bindarit**

El compuesto Bindarit es un inhibidor de la síntesis de CCL2, que actúa sobre isoformas específicas de NF $\kappa$ B (Sironi et al. 1999; Mora et al. 2012). Esta droga fue sintetizada y cedida por el Dr. Angelo Guglielmotti de Angelini Pharma, Italia. La droga se disolvió a una concentración de 100 mM en NaOH 1M, se filtró por filtro de 0,22  $\mu$ m, se realizaron las diluciones correspondientes de trabajo y se conservó a -20°C (según lo descrito en: Mora et al. 2012).

### **3.2.2 Animales**

#### Condiciones generales de mantenimiento.

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57-BL/6J, mantenidos en el bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes. Excepto que se indique lo contrario, se trabajó con machos adultos (2-5 meses, 25-32 gramos) mantenidos bajo un fotoperíodo de 12:12 (luz:oscuridad, LO), con libre acceso a agua y comida. En el caso de experimentos realizados en condiciones de LO, se utilizó como referencia la hora de apagado de las luces, denominada por convención ZT12.

#### Registro de actividad locomotora.

Los animales se colocaron en jaulas individuales provistas con ruedas de locomoción. La actividad en rueda fue registrada mediante el sistema ARCHRON (Argentina), almacenando la cantidad de revoluciones de cada rueda cada cinco minutos. Los animales fueron expuestos inicialmente a un fotoperíodo L:O 12:12 por al menos 7 días, y luego transferidos a condiciones de oscuridad constante (O:O). Todos los tratamientos fueron realizados luego de mantener los animales por al menos 10 días en O:O. Bajo condiciones de O:O el horario de referencia utilizado corresponde al inicio de la actividad locomotora, que se fijó convencionalmente como CT 12.

### Cirugía de implantación de cánulas guía.

Los animales fueron anestesiados con un cocktail de de ketamina-xilacina (70 y 10 mg/kg, respectivamente). Una vez perdido el reflejo podal, se removió el pelo de la parte superior de la cabeza, y se situó a los animales en el marco estereotáxico (Stoelting) en el que se realizó la implantación de las cánulas guía de 26-gallon (Plastics One). Las cánulas fueron dirigidas a la parte inferior del tercer ventrículo, por sobre los NSQ (coordenadas relativas a Bregma: anteroposterior -0,5 mm, dorsoventral -5,0 mm y mediolateral 0,0 mm; Figura 2.2.1). Las cánulas fueron fijadas al cráneo mediante cemento dental, colocando previamente dos tornillos de sujeción en el hueso (Plastics One). Una vez recuperados de la anestesia, los animales se mantuvieron en LO por al menos 48 h en jaulas individuales, y luego fueron transferidos a condiciones de OO, para el registro de actividad locomotora.

### Administraciones intracerebroventriculares.

Para la administración intracerebroventricular (Icv), se utilizaron animales implantados con cánulas guía, tal como descrito anteriormente, y mantenidos en OO. Las administraciones se realizaron a CT 15, bajo la iluminación con luz roja de baja intensidad. Los animales se sujetaron manualmente, se retiró el tapón de la cánula y se introdujo por la misma un inyector de 33-gallon (Plastics One) que sobresalía 0.1 mm del extremo de la cánula. En todos los casos se administró 1  $\mu$ l de volumen final, a un flujo de 0,2  $\mu$ l/minuto mediante una microjeringa (Hamilton), y, al final la administración, se esperó 1 minuto antes de retirar el inyector y volver a colocar el tapón de la cánula. En el caso de que el mismo animal recibiera más de un tratamiento por vía Icv, los mismos se administraron con no menos de 10 días de separación entre cada uno.

### Perfusiones.

Los animales fueron anestesiados a ZT 16 con una cocktail de ketamina-xilacina (150 y 10 mg/kg, respectivamente). Una vez perdido el reflejo podal, los animales se sujetaron a una superficie de disección, y se realizó una incisión longitudinal en la pared abdominal, cortando luego el diafragma para tener acceso a la cavidad torácica. Se colocó una aguja de 30-gallon en el ventrículo izquierdo del corazón, y se realizó una pequeña incisión en la aurícula derecha. En primer lugar, los ratones fueron perfundidos intracardiácamente con 15 ml de *buffer* fosfato salino (PBS) 0,01M, pH 7,4, y luego con 40 ml de fijador (paraformaldehído 4% en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7,4). Una vez que se confirmó el proceso de fijación (rigidez del animal), se procedió a remover los cerebros, que fueron post-fijados por 14-16 horas en la solución de fijador a 4°C. A continuación, los cerebros se sumergieron en una solución crioprotectora (PBS 0,01M, 30% sacarosa) por 24-48 hs y luego conservados a -80°C hasta su procesamiento para inmunofluorescencia o inmunohistoquímica (ver más adelante).

### Extracción de ARNm.

Los animales fueron sacrificados en el horario correspondiente y el tejido correspondiente a los NSQ se recolectó en 100 µl solución Trizol (Life Technologies), en condiciones libres de RNAsas. Este se homogeneizó en la solución Trizol, y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se le agregó 20µl de cloroformo frío por ml de Trizol, se agitó e incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 12000g durante 15 minutos a 4°C, y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo estéril. Se agregó 50µl de Isopropanol frío, se mezcló y se incubó overnight a -80°C. Luego, se centrifugó a 12000g durante 10 minutos a 4°C para obtener el pellet de RNA. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 100µl de Etanol 75% frío, se mezcló y centrifugó a 7500g durante 5 minutos a 4°C. Se dejó secar el pellet durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se resuspendió en 15µl de agua destilada estéril. Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría utilizando el equipo

NanoDrop1000 (Thermo Scientific). Se sintetizó el cDNA a partir de 200ng de RNA total utilizando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen) con oligonucleótidos OligodT.

#### Tratamientos con LPS.

Los animales recibieron una dosis de 100 µg/kg de LPS (Escherichia coli serotipo 0111:B4 Sigma-Aldrich) intraperitoneal o vehículo (solución salina) a ZT 2 o ZT 14. 2 horas más tarde, se procedió a perfundir los animales y remover los cerebros, tal como se describió anteriormente y se procesaron para inmunohistoquímica contra CCR2 (ver más adelante).

#### Tratamientos con Bindarit y LPS.

Los animales, a los que se les realizó la implantación de la cánula guía, se transfirieron a condiciones de O:O en jaulas equipadas con ruedas para el registro de actividad locomotora. En todos los casos, el primer tratamiento se realizó pasados 15 días de la operación.

##### *Administración de LPS intraperitoneal y Bindarit intracerebroventricular.*

Los animales recibieron por vía Icv 1 µl de una solución 100 µM de Bindarit a CT 14,5, 30 minutos antes de una administración intraperitoneal (Ip) de 100 µg/kg de LPS. Como controles se utilizaron animales que recibieran vehículo en una de las vías de administración y tratamiento en la otra, o vehículo en ambas vías.

##### *Administración de Bindarit intracerebroventricular seguida de pulso de luz.*

Los animales recibieron por vía Icv. 1 µl de una solución 100 µM de Bindarit a CT 14,5, 30 minutos antes de recibir un pulso de 10 minutos de 200 lux de luz blanca. Como controles se utilizaron animales que recibieron Bindarit sin recibir pulso o vehículo intracerebroventricular seguido o no de pulso.

Extracción de proteínas de tejido.

Los animales fueron inyectados ip con LPS 100 µg/kg o vehículo a ZT15 y fueron sacrificados por dislocación cervical 2 horas después (ZT17). Se extrajo el cerebro de cada animal, se congeló a -20°C y luego se cortaron con bisturí los NSQ bajo la lupa, los cuales fueron colocados en buffer fosfato salina (PBS) con un cóctel de inhibidores de proteasas (P8340- Sigma Aldrich) en una concentración 1X. Luego, se homogenizó la muestra utilizando un vástago y se colocó 15 minutos en hielo. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 12000 r.p.m., se separó el sobrenadante y se guardó a -20°C.

**3.2.3 PCR en tiempo real.**

Se realizó una reacción de PCR en tiempo real utilizando el equipo Step One Plus (Applied Biosystems) y la mezcla de reacción Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). El ciclado utilizado fue 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizaron curvas con distintas concentraciones de ADNc molde para calcular la eficiencia de amplificación de los primers y el tamaño del producto se chequeó por corrida electroforética en gel de agarosa. La secuencia de *primers* utilizados fue:

Gen	Secuencia <i>forward</i>	Secuencia <i>reverse</i>
CCL2	5'-CGGCTGGAGCATCCACGTGTT-3'	5'-TGGGGTCAGCACAGACCTCTC-3'
CCR2	5'- AAGGAGCCATACCTGTAAATGCC-3'	5'- AGTATGCCGTGGATGAACTGAG -3'
HPRT	5'- TGTTGGATACAGGCCAGAC-3'	5'-TGGCAACATCAACAGGACTC-3'
GAPDH	5'- TGCACCACCAACTGCTTAG-3'	5'- GGATGCAGGGATGATGTTC-3'

**Tabla 3.2.1 Secuencias de primers utilizados en el Capítulo 2.**

### **3.2.4 Medición de Quimioquinas y Citoquinas.**

Para realizar la medición de CCL2 y de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-10 de las muestras de proteínas recolectadas se utilizó el *Citometric Bead Array Mouse Inflammation Kit* (Becton, Dickinson and Company). El análisis se realizó tal como se describió en la sección **2.2.4.2**.

### **3.2.5 Cuantificación de proteínas totales.**

Las proteínas totales en las muestras recolectadas de los NSQ se cuantificaron mediante el *Qubit protein assay* (Life Technologies) en un fluorómetro Qubit (Life Technologies).

### **3.2.6 Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica de cortes de cerebro.**

El protocolo para la marcación de CCR2 en cerebro fue tomado de (Foresti et al. 2009). Se realizaron cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$  conteniendo la región de los NSQ a partir de los cerebros obtenidos luego de la perfusión mediante un crióstato. Luego de 2 lavados con PBS 0,1M (pH 7,4), los cortes se incubaron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5% en PBS por media hora y luego en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% en PBS por 1 hora. A continuación se realizaron 5 lavados con PBS seguidos de bloqueo en suero de caballo 3% y Tween 0,05% en PBS durante 1 hora. Luego se incubaron con una dilución 1:200 en PBS con Tween 0,05% y suero de caballo 3% de un anticuerpo anti CCR2 (Abcam) o con anticuerpo anti CCR2 junto con anticuerpo anti GFAP (hecho en ratón) por 48 horas en agitación a 4°C. A continuación se realizaron 5 lavados con PBS y se procedió al revelado. En ambos casos se realizaron controles evitando el anticuerpo primario, y los cortes se observaron en un microscopio Olympus Bx41 y se tomaron imágenes mediante una cámara Q-color 3 (Olympus).

Para el caso de los cortes marcados para inmunofluorescencia, se incubaron con una dilución 1:200 de un anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa Fluor® 594 (Jackson ImmunoResearch) y, en el caso de las doble marcaciones, con un

anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa Fluor® 488 (Jackson ImmunoResearch) durante 90 min, agitando a temperatura ambiente. Finalmente los montes se montaron en Vectashield (Vector Labs), que posee DAPI como contratinción nuclear.

Para el caso de los cortes marcados para inmunohistoquímica, se realizó una incubación con Avidina-peroxidasa (1:200, Vector) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBS, se realizó la reacción de revelado utilizando el kit VIP de Vector. A continuación los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio, y se deshidrataron por incubación en alcoholes de concentración creciente y finalmente se incubaron en xileno y se colocó el cubreobjeto con medio de montaje sintético (bálsamo de Canadá).

### **3.2.7 Análisis Bioinformático.**

Se realizó un análisis bioinformático en el gen murino *Ccr2* (NC\_000075.6) para estudiar la presencia de secuencias consenso que participan en la regulación por genes del reloj circadiano. Se utilizaron programas de búsqueda de patrones con el objetivo de identificar las secuencias correspondientes a: E-box/E'box, E-box no canónicos, D-box, sitios CRE, sitios RRE y sitios APOE. Se sabe que estos sitios regulan la transcripción de diversos genes controlados por el reloj, y que principalmente actúan en las cercanías de las secuencias promotoras. Por ello, en primer lugar, se utilizó la base de datos Eukaryotic Promoter Database (EPD) del SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) (<http://epd.vital-it.ch/>) para hallar el promotor del gen murino de *Ccr2*.

Se utilizaron realizó una búsqueda de secuencias consenso establecidas en el gen *Ccr2* mediante el programa Sequence Manipulation Suite, DNA Pattern Find ([http://www.bioinformatics.org/sms2/dna\\_pattern.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/dna_pattern.html)). A partir de todas las secuencias encontradas se hizo una selección utilizando como referencia la posición de la región promotora, para únicamente considerar las próximas a la misma.

### **3.2.8 Análisis de datos y estadística.**

#### Análisis de ritmos de actividad locomotora.

Los análisis de los efectos de los tratamientos sobre los ritmos de actividad locomotora se realizaron con el software El Temps (versión 1.219), desarrollado por Antoni Diez Noguera en la Universidad de Barcelona. Para la cuantificación de los cambios de fase, se trazó una línea que uniera el inicio de la actividad locomotora para los 10 – 15 días previos al tratamiento, y luego se realizó lo mismo (usando una línea con la misma pendiente) para los 10 – 15 días posteriores al tratamiento. La diferencia en la fase entre ambas líneas, al día inmediatamente posterior al tratamiento fue considerado el cambio de fase. Este procedimiento fue realizado por cuatro observadores independientes, que desconocían el grupo o tratamiento que se estaba analizando. El valor promedio entre los cálculos de cada observador fue utilizado como medida del cambio de fase para el análisis estadístico. Los efectos de los tratamientos sobre las fases fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Fisher.

#### Análisis de los niveles de Quimioquinas y Citoquinas en los NSQ.

Las concentraciones de las muestras se calcularon según lo descrito en el **Capítulo 1**, para el mismo kit. Los valores de concentración de citoquinas y quimioquinas en los extractos proteicos de los NSQ se relativizaron al valor de proteínas totales presentes en cada muestra. Las diferencias en los niveles de inducción para cada horario y tratamiento se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguida del test de comparaciones múltiples de Sidak.

#### Análisis de los niveles de ARNm de CCL2 y CCR2.

Los resultados fueron cuantificados usando el software LinReg PCR (Ramakers et al. 2003) para determinar los Ct de cada reacción y luego cuantificados utilizando

el método descrito por Pfaffl (Pfaffl 2001). Para la puesta a punto de cada set de primers se construyó una curva estándar de 5 puntos (serie de diluciones seriadas 1/2) para cada gen y se determinó la concentración de primers (0,2; 0,4; 0,6; 0,9  $\mu$ M) a la cual la eficiencia era mayor (esta fue luego utilizada en las reacciones subsiguientes). Los niveles de cada gen fueron normalizados con los promedios geométricos de los niveles de los genes de referencia *Gapdh* y *Hprt*. Las diferencias entre los niveles de expresión para cada horario fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey.

En todos los casos el software utilizado para el análisis estadístico fue el GraphPad Prism Software, versión 5.0 o 6.0 y se consideraron estadísticamente significativos los efectos o diferencias con un  $p < 0,05$ . Los datos mostrados se representan como la media  $\pm$  el error estándar.

#### Expresión de CCR2.

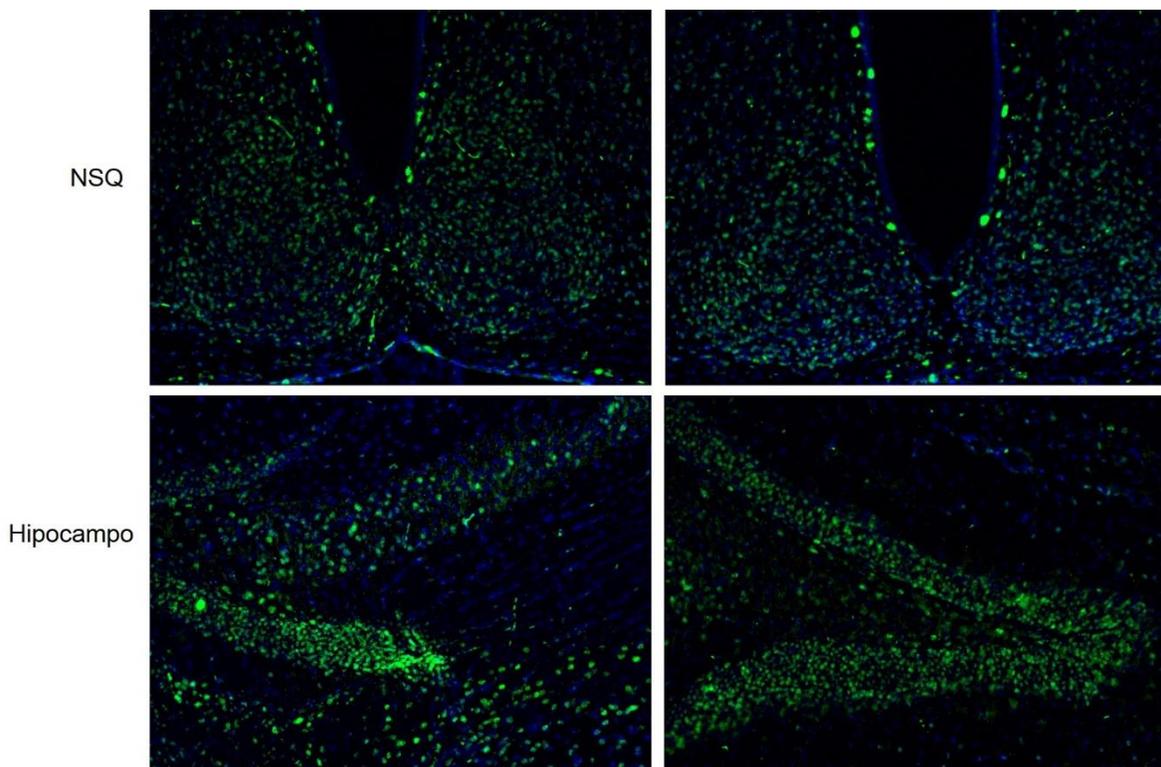
Las imágenes de cortes conteniendo los NSQ inmunomarcados contra CCR2 se obtuvieron según 3.2.6. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ. Se definieron una ROI que abarcaba cada NSQ y se contó el número de células marcadas en ambos núcleos mediante la herramienta “*Cell counter*” del software. Los efectos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparaciones múltiples exacta de Fisher.



### 3.3 Resultados.

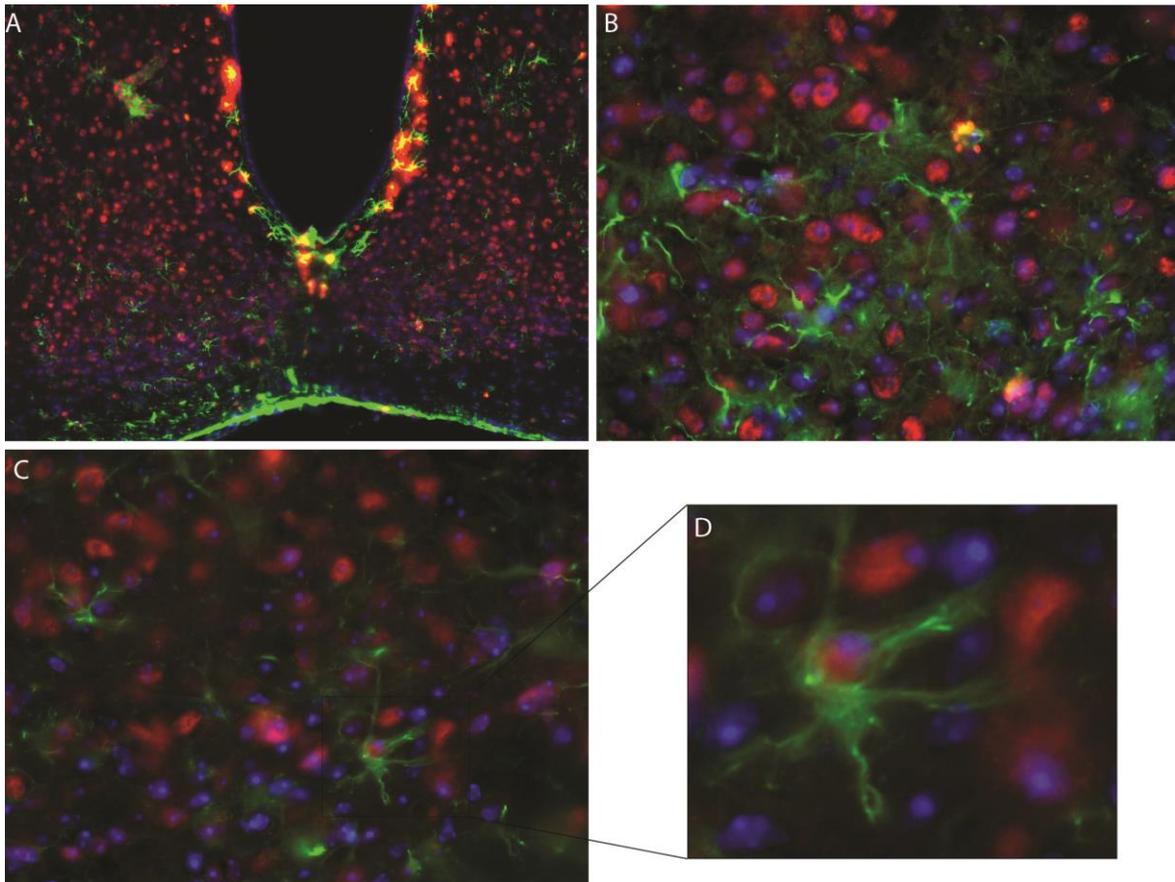
#### 3.3.1 Expresión de CCR2 y CCL2 en los NSQ de ratón.

La expresión de CCR2 y CCL2 en condiciones basales ha sido descrita en algunas regiones del cerebro entre las que se incluye: el cerebelo y la pituitaria anterior para ambas moléculas; núcleos supraóxicos, área lateral hipotalámica, giro dentado y corteza para CCR2 y el bulbo olfatorio para CCL2 (Rostène et al. 2007). Si la quimiocina CCL2 tiene un rol en la respuesta del reloj circadiano central a estímulos inmunes, es de esperar que su receptor se encuentre expresado en estas estructuras. La inmunomarcación contra CCR2 mostró que este receptor se encuentra expresado en los NSQ de ratón. A su vez, se encontró marca en el hipocampo, tal como se había descrito en bibliografía (**Figura 3.3.1**).



**Figura 3.3.1** Expresión de CCR2 (verde) en los NSQ e hipocampo de ratón. Aumento 100X. La marcación azul corresponde a los núcleos celulares.

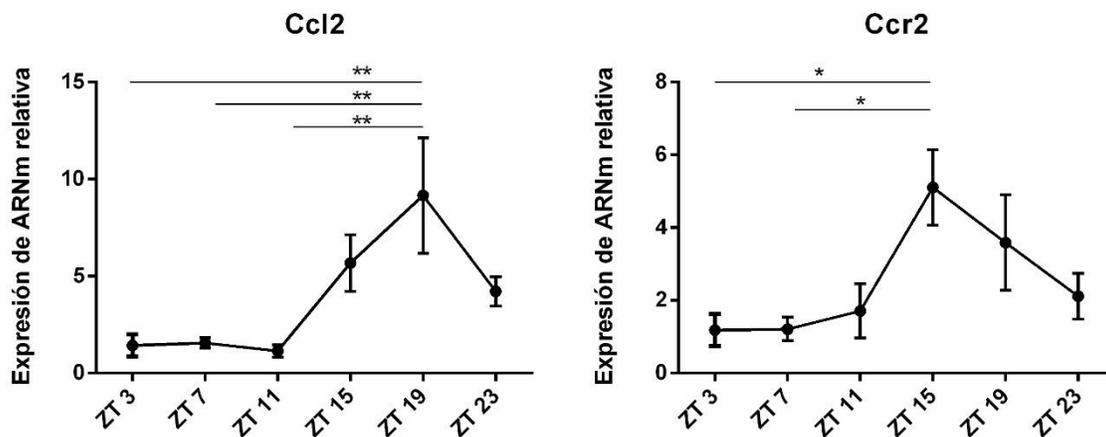
Dado que los cultivos primarios de astrocitos de NSQ son capaces de liberar CCL2 (Capítulo 1, **Figura 2.3.7**) se analizó si el mismo tipo celular expresaba también el receptor para esta molécula, lo que posibilitaría una respuesta de los astrocitos a CCL2, ya sea secretado por ellos mismos o por otros tipos celulares. Analizamos la posible expresión de CCR2 en los astrocitos de NSQ mediante la doble marcación de CCR2 y GFAP en cortes provenientes de animales sacrificados a ZT 16. Sin embargo, no encontramos señales de colocalización entre ambas moléculas en los NSQ de ratón (**Figura 3.3.2**), lo que indicaría que, en este núcleo, los astrocitos no expresan el receptor de la quimioquina CCL2. Se observaron, en varios cortes, células GFAP-positivas (astrocitos) rodeando a células que expresan el receptor, probablemente somas neuronales (**Figura 3.3.2 D**).



**Figura 3.3.2 (Página anterior). Doble marcación para CCR2 y GFAP en NSQ de ratón.** Imágenes de cortes de cerebros extraídos a ZT 16 en la región de los NSQ marcados contra CCR2 (rojo), GFAP (verde) y con marca nuclear en azul. **A)** ampliación 100X. **B)** y **C)** ampliación 400X. **D)** magnificación de la zona marcada en **C).**

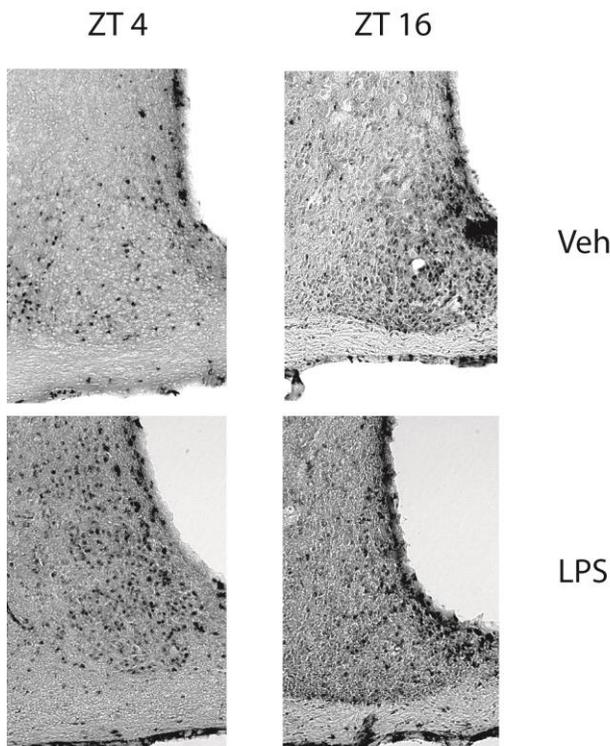
### 3.3.2 Variación diaria en los niveles de Ccl2 y Ccr2 en los NSQ de ratón.

Una vez demostrada la presencia del receptor de CCL2 nos preguntamos si la expresión de ARNm de Ccl2 y del receptor mismo presentaba variaciones diarias en los NSQ de ratón. El análisis de los niveles de expresión de ARNm de Ccr2 y Ccl2 arrojó que existe una variación diaria en la expresión de ambas moléculas, con un pico a ZT 15 para el receptor, y a ZT 19 para Ccl2 (para Ccr2: ANOVA de una vía, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p < 0,05$  para ZT 15 contra ZT 3 y ZT 7,  $p > 0,05$  para las demás comparaciones; para Ccl2: ANOVA de una vía, seguido de prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p < 0,01$  para ZT 19 contra ZT 3, ZT 7 y ZT 11,  $p > 0,05$  para los demás contrastes; **Figura 3.3.2**,  $n = 4$ ).

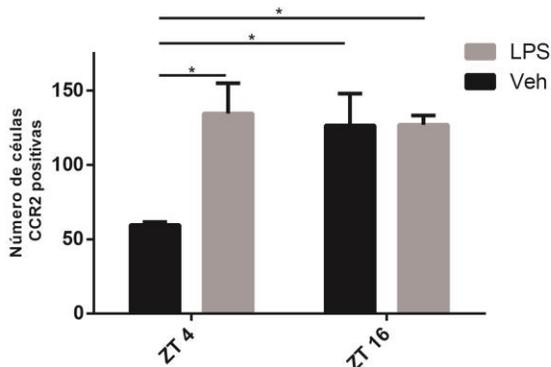


**Figura 3.3.3 Ritmos diarios de expresión del ARNm Ccr2 y Ccl2 en los NSQ de ratón.** Se muestran los niveles relativos de ARNm de Ccl2 (izquierda) y Ccr2 (derecha) en los NSQ de ratón, en diferentes horarios del ciclo L:O.

A continuación, analizamos si lo observado para el receptor *Ccr2* a nivel de ARNm, tenía un correlato a nivel de proteína y, además, si la activación inmune periférica era capaz de modificar la expresión de este receptor. Encontramos diferencias entre ZT 4 y ZT 16 en el número de células positivas para CCR2 en los NSQ, a través de inmunohistoquímica. A su vez, la administración intraperitoneal de LPS produjo un aumento en el número de células positivas para CCR2 a ZT 2, pero no a ZT 14, medido dos horas más tarde (**Figura 3.3.3**; ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Fisher;  $p < 0,05$  para Veh a ZT 4 contra Veh a ZT 16 y contra LPS a ZT 4 y 16;  $p > 0,05$  para los demás contrastes;  $n = 4$ ).



**Figura 3.3.4 Número de células CCR2 positivas en los NSQ. Panel superior:** imágenes de cortes de cerebros extraídos a ZT 4 o ZT 16, inmunomarcados contra el receptor CCR2, en animales que recibieron Veh o LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ip. a ZT 2 y 14, respectivamente. **Panel inferior:** cuantificación del número de células marcadas en cada condición

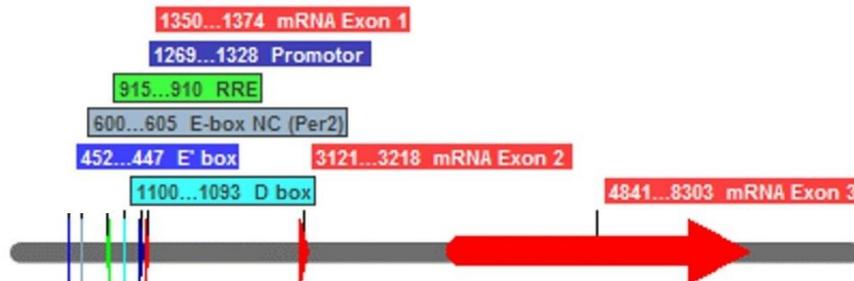


### 3.3.3 Análisis bioinformático de la región promotora de *Ccr2*.

Como se describió en la introducción, trabajos previos han descrito posibles elementos regulatorios en el gen *Ccr2* que mediarían el control circadiano de su expresión, tales como sitios E-box y de respuesta a ROR y REV-ERB- $\alpha$ . Considerando nuestros hallazgos respecto a una variación diaria en la expresión de *Ccr2*, tanto a nivel de ARNm, como de proteína, realizamos un análisis bioinformático buscando posibles secuencias regulatorias que medien un control circadiano de este gen. En primer lugar, se utilizó la base de datos Eukaryotic Promoter Database (EPD) del SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) (<http://epd.vital-it.ch/>) para hallar el promotor del gen murino de *Ccr2*. Se encontró que la región promotora se encuentra entre las posiciones 1269 a 1328 del gen. A partir de este marco de referencia se utilizaron diversos programas de búsqueda de patrones y motivos en secuencias nucleotídicas para identificar las secuencias consenso de E-box/E'box, E-box no canónicos, D-boxes, sitios CRE, sitios RRE y sitios APOE (Bozek et al. 2009). Nuestro análisis describió la presencia de 3 sitios de respuesta a ROR y REV-ERV- $\alpha$  (RORE), así como 4 sitios E-box/E'-Box, 2 sitios E-Box no canónicos (de Per2 y de MYOD) y un sitio D-box (un elemento que produce un pequeño retraso en la fase de transcripción mediada por E/E'-box). En la **Tabla 3.3.1** se encuentran los detalles de esta búsqueda. Asimismo, en la **Figura 3.3.5** se muestra un mapa del gen *Ccr2* murino, ilustrando las secuencias de regulación del reloj, el promotor y el mRNA que resulta de la transcripción de este gen.

Secuencia regulatoria	Posición en el gen <i>Ccr2</i>	Cadena DNA	Posición respecto del promotor	Secuencia consenso utilizada
E box No Canónico (Per2)	600-605	+	-669	CACGTT
E box No Canónico (MYOD)	1898-1903	+	629	CAGCTT
Ebox/E' box	447-452	-	-817	CAGGT[G/T]
	1465-1470	-	201	
	1590-1595	+	321	
	2377-2382	+	1108	
D-box	1093-1100	-	-169	TTATG[T/C]AA
RORE	910-915	-	-354	AGGTCA
	2575-2580	+	1306	
	2687-2692	+	1418	

**Tabla 3.3.1.** Resultado de la búsqueda bioinformática de los patrones y motivos correspondientes a secuencias consenso reguladas por el reloj. Se muestran las secuencias analizadas, la posición de cada una dentro del gen de *Ccr2* murino y la posición relativa la secuencia promotora.

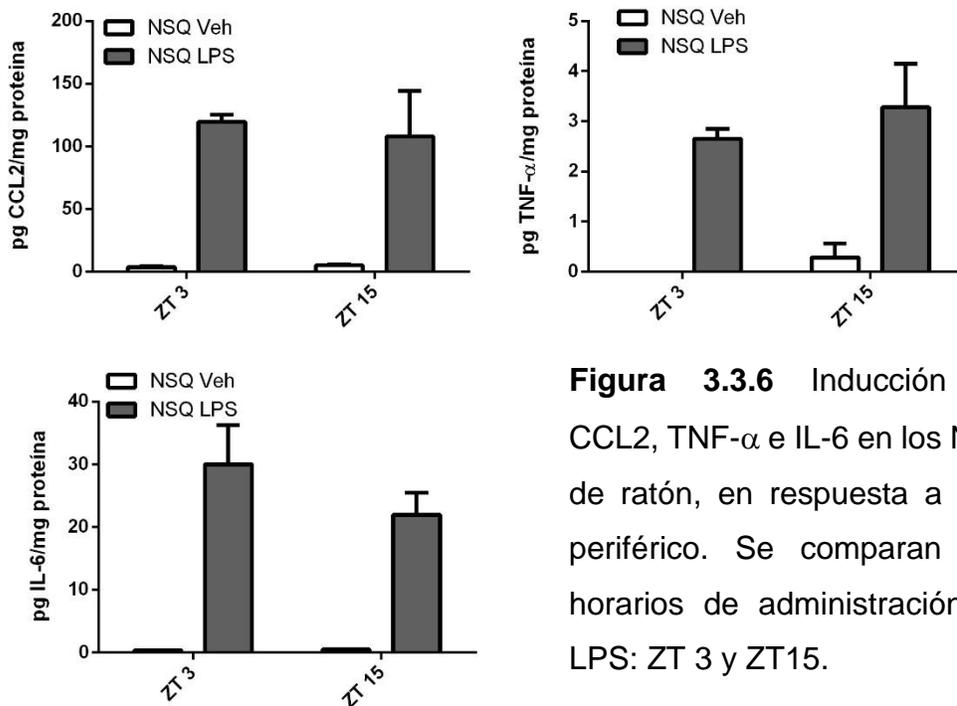


**Figura 3.3.5.** Mapa del gen *Ccr2* en el que se denotan las secuencias consenso de regulación circadiana que se hallan río arriba del inicio de transcripción. También se marca la posible región promotora hallada en nuestro análisis.

### 3.3.4 Inducción de CCL2 y citoquinas proinflamatorias en los NSQ de ratón en respuesta a LPS.

La expresión del receptor CCR2 en los NSQ sugiere que los núcleos serían capaces de responder a la quimiocina CCL2. Con el fin de estudiar qué moléculas participan en la respuesta de los NSQ a estímulos inmunes periféricos, estudiamos, en primera medida, si la inducción de CCL2, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL12p70, IL-6 e IFN- $\gamma$  en los NSQ en respuesta a LPS periférico.

La administración de 100  $\mu$ g/kg de LPS intraperitoneal produjo un incremento en los niveles de CCL2, TNF- $\alpha$  e IL-6 en los NSQ de ratón (**Figura 3.3.3**). Sin embargo, a la hora de analizar si existían diferencias diarias en la inducción de estas moléculas, encontramos que no había variaciones en los niveles de inducción entre



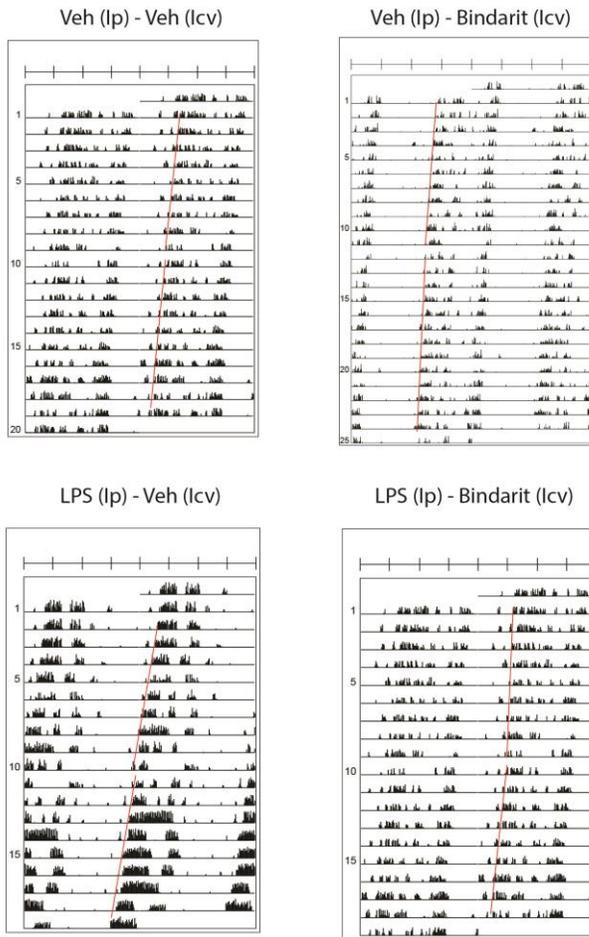
**Figura 3.3.6** Inducción de CCL2, TNF- $\alpha$  e IL-6 en los NSQ de ratón, en respuesta a LPS periférico. Se comparan dos horarios de administración de LPS: ZT 3 y ZT15.

animales que recibieron el LPS a ZT 15 y aquellos que lo recibieron a ZT 3 (ANOVA de dos vías,  $p < 0,001$  para el factor droga,  $p > 0,05$  para el factor tiempo de tratamiento y para la interacción, para CCL2, TNF- $\alpha$  e IL-6, **Figura 3.3.3**,  $n = 3$ ). Las citoquinas IL-10, IL12p70 e IFN- $\gamma$  no presentaron niveles detectables en el tejido, en ninguna de las condiciones ensayadas.

### 3.3.5 Rol de CCL2 en la respuesta del reloj circadiano a LPS.

A partir de los hallazgos anteriores que nos indicaron la presencia del receptor CCR2 en los NSQ, así como la inducción de CCL2 en los NSQ en respuesta a la administración de LPS intraperitoneal, cabe preguntarse si CCL2 participa de alguna manera en los cambios de fase inducidos por la endotoxina. Para esto nos valimos de la herramienta farmacológica Bindarit. Esta molécula es capaz de inhibir la síntesis de CCL2 tanto in vitro como in vivo, actuando a nivel de la vía de NF $\kappa$ B (Mora et al. 2012). Analizamos entonces, el efecto de la inhibición de la síntesis de CCL2 a nivel de los NSQ en los cambios de fase provocados por la administración intraperitoneal de LPS (100  $\mu$ g/ml). Encontramos que la administración de Bindarit icv 30 minutos antes de la inyección intraperitoneal de LPS redujo la magnitud de los cambios de fase producidos por la endotoxina (ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Fisher,  $p < 0,05$  para Veh icv + LPS ip contra Veh icv + Veh ip,  $p < 0,01$  para Veh icv + LPS ip contra Bindarit icv + Veh ip,  $p < 0,01$  para Veh icv + LPS ip contra Bindarit icv + LPS ip,  $p > 0,05$  para las demás comparaciones, **Figura 3.3.7**,  $n = 9$ ).

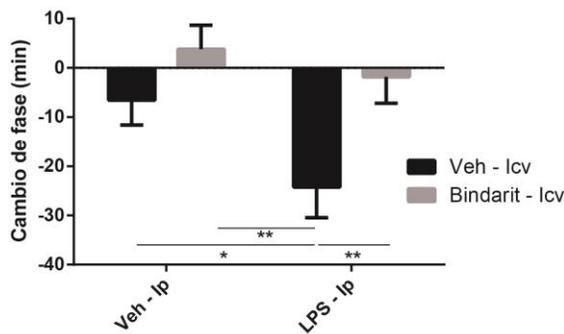
A



**Figura 3.3.7.** La inhibición de la síntesis de CCL2 bloquea los cambios de fase inducidos por LPS intraperitoneal. **A)**

Actogramas representativos de animales que recibieron diferentes combinaciones de tratamientos Icv (a CT 14.5) e Ip (a CT 15). **B)** La inhibición de la síntesis de CCL2 a nivel de los NSQ inhibe los cambios de fase inducidos por LPS.

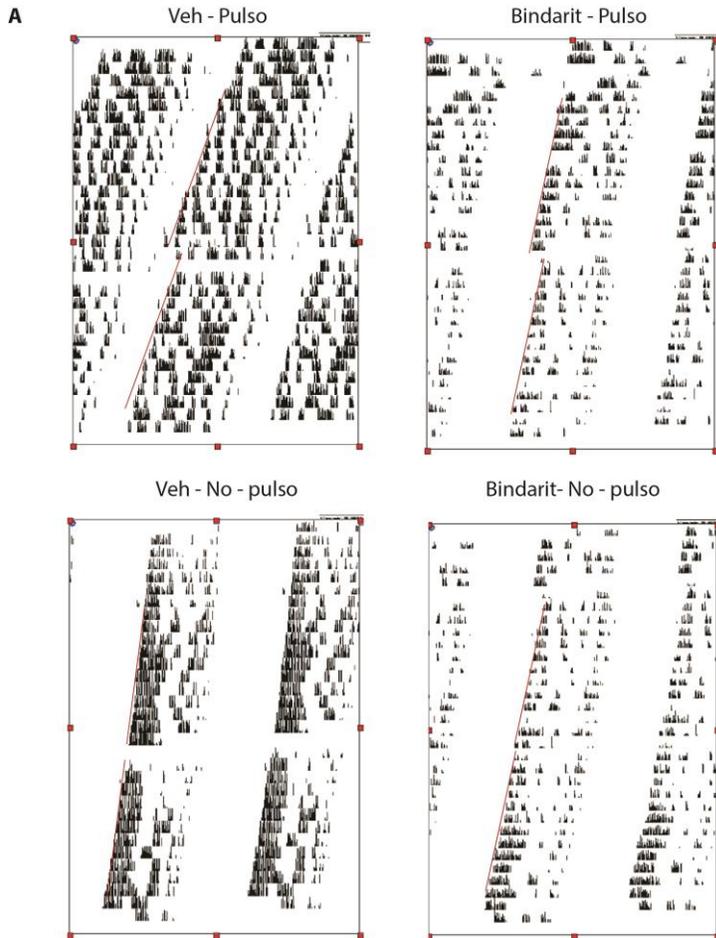
B



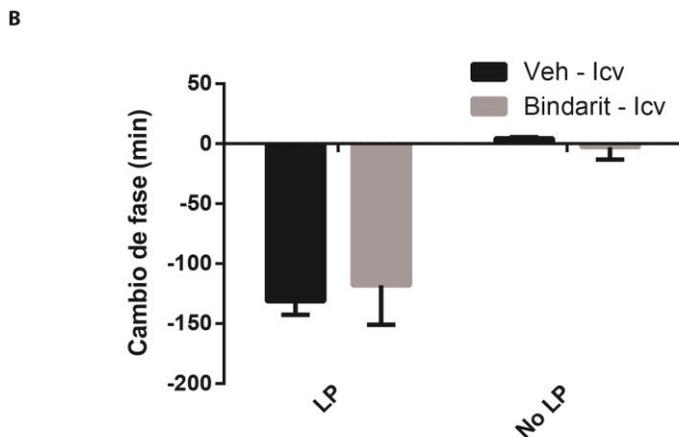
### 3.3.4 Efectos de la inhibición de la síntesis de CCL2 en la sincronización fótica del reloj.

Para profundizar el rol de CCL2 en el reloj circadiano, caracterizamos si esta molécula participa en los cambios de fase que llevan a la sincronización fótica del

reloj. Para ello administramos en forma Icv Bindarit, 30 minutos antes de un pulso de luz saturante de 200 lux. No encontramos diferencias en la magnitud de los cambios de fase entre animales que recibieron Bindarit previo al pulso de luz y aquellos tratados con vehículo (ANOVA de dos vías,  $p < 0,001$  para el factor luz,  $p > 0,05$  para el factor droga e interacción, **Figura 3.3.8**,  $n = 5$ ).



**Figura 3.3.8** La inducción de CCL2 a nivel de los NSQ no participa en los cambios de fase activados por luz. **A)** Actogramas representativos de animales que recibieron Vehículo o Bindarit Icv a CT 14.5, seguido o no de un pulso de luz a CT 15. **B)** La inhibición de la síntesis de CCL2 no altera la respuesta del reloj circadiano a los pulsos de luz durante la noche temprana.



### 3.4 Discusión.

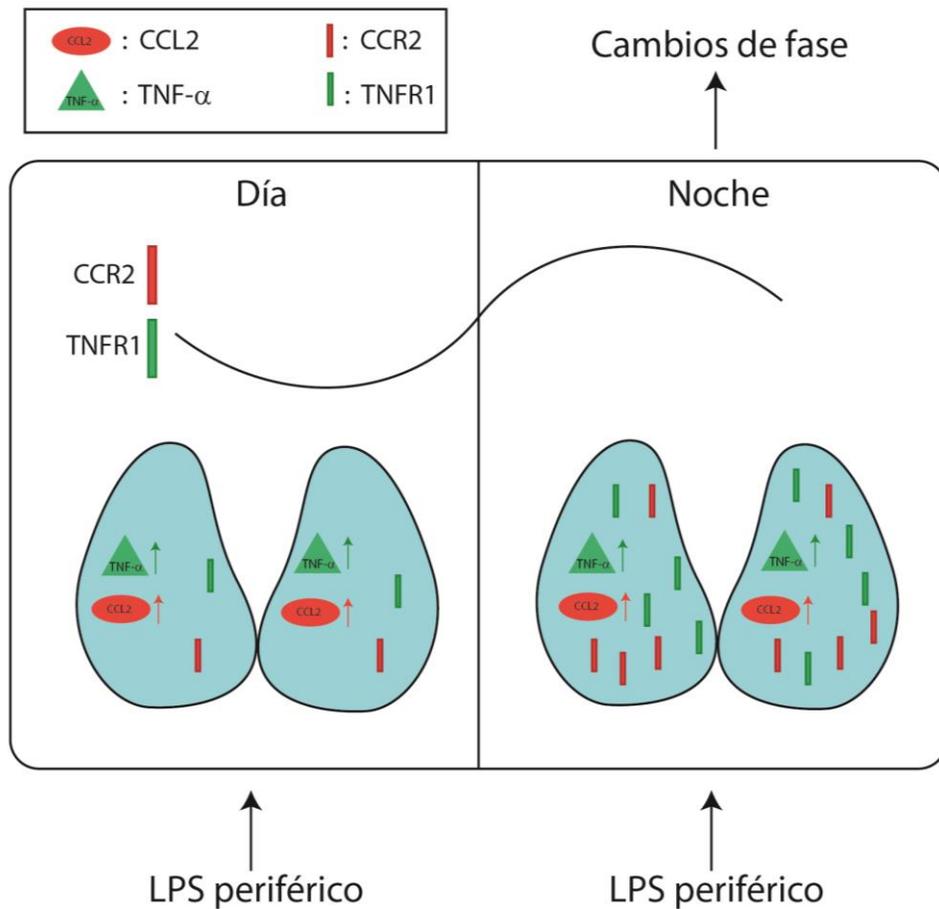
Como se mencionó en la introducción, existe un número creciente de trabajos que postulan un importante rol para la quimioquina CCL2 en el SNC. Los resultados del presente capítulo sugieren que esta molécula estaría involucrada en la respuesta al reloj a estímulos inmunes periféricos. El reloj circadiano es sensible a la administración de LPS intraperitoneal durante la noche temprana, pero no en otros momentos del ciclo circadiano (Marpegán et al. 2005). El estudio de los posibles mecanismos responsables de este efecto ha sugerido un rol para la citoquina TNF- $\alpha$  actuando a nivel de los NSQ (Leone et al. 2012; Paladino et al. 2014). Como se describió en el **Capítulo 1**, los astrocitos de los NSQ son buenos candidatos a ser los mediadores celulares a nivel de los NSQ, de la respuesta del reloj a estímulos inmunes. Sin embargo, los actores moleculares que participan en esta interacción (además de TNF- $\alpha$ ) no están caracterizados en su totalidad. En el **Capítulo 1** describimos una fuerte inducción de la secreción de la quimioquina CCL2 en astrocitos de NSQ, en respuesta a la activación inmune. Nos propusimos entonces investigar si esta quimioquina es partícipe de la respuesta del reloj circadiano a la activación inmune.

Encontramos que los NSQ expresan tanto el receptor CCR2 como la quimioquina CCL2, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Además, la expresión del ARNm de ambos genes varía a lo largo del día, con un máximo durante la noche. El máximo de expresión de CCR2, tanto a nivel de ARNm, como de proteína, coincide con el momento en el que el oscilador es sensible a los estímulos inmunes. De hecho, la administración de LPS durante la noche temprana es incapaz de aumentar los niveles de CCR2, efecto que sí ocurre si la endotoxina se administra durante el día. Esto sugiere un posible efecto “techo” en los niveles de CCR2 durante la noche temprana. La variación diaria en los niveles de un receptor inmune fue descrita en nuestro grupo para el receptor de TNF- $\alpha$ , TNFR1, con un máximo también durante la noche temprana (Paladino et al. 2014). El análisis de la secuencia del gen Ccr2 en su región promotora arrojó diversos elementos de regulación que permitirían un control circadiano sobre este gen, destacándose 4 sitios E-box/E'-box, 3 sitios

RORE (2 de ellos dentro de secuencias intrónicas, lo que es capaz de modular la expresión de *Cry*; Ukai-Tadenuma et al. 2011), así como 2 E-box no canónicos y un D-box. El gen *Ccl2* también posee sitios E-box y RORE, que regulan su expresión rítmica (Nguyen et al. 2013; Sato et al. 2014). Los patrones de expresión de *Ccl2* y de *Ccr2* coinciden entonces con un rol inhibitorio por parte de PER/CRY (actuando a nivel de E/E'-box), cuyos niveles decaen al comenzar el período de oscuridad, momento donde se observa el máximo de expresión de *Ccr2*. Además, podría haber también una inhibición de la transcripción de *Ccr2* por parte de REV-ERB $\alpha$ , uniéndose a los sitios RORE, (mecanismo ya descrito para *Ccl2*), ya que REV-ERB $\alpha$  se encuentran en su mínimo de expresión en los NSQ durante la noche (Chang & Guarente 2013). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que la ventana temporal durante la cual los NSQ son sensibles a estímulos inmunes esté dada por los niveles de expresión de los receptores para moléculas proinflamatorias como CCL2 y TNF- $\alpha$  los cuales pueden ser regulados por el reloj circadiano.

Se encontró, además, que la expresión de CCL2 en los NSQ puede ser inducida en respuesta a 100  $\mu$ g/kg de LPS intraperitoneal, aunque su inducción no varía dependiendo del momento del día en que se administre. Asimismo, se observó el mismo comportamiento para TNF- $\alpha$  e IL-6. Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que la inducción periférica de citoquinas y quimioquinas tampoco varía con el horario de activación por dosis bajas de LPS (Leone et al. 2012). El bloqueo de la inducción de CCL2, a nivel de los NSQ, fue capaz de inhibir los efectos del LPS periférico sobre el reloj circadiano. Estos resultados sugieren que, para que ocurran los cambios de fase en respuesta a LPS Ip, la inducción de CCL2 en los NSQ sería necesaria (ya que su bloqueo los inhibe), pero no suficiente (ya que ocurre también en horarios en los que los cambios de fase no ocurren). Esto podría deberse o bien a la variación descrita previamente en los niveles del receptor CCR2, que daría una ventana temporal específica en lo que se refiere a la sensibilidad de los NSQ a la quemoquina (**Figura 3.4.1**), a una variación circadiana en la capacidad de activación de las vías río debajo de CCR2, o, a una combinación de ambos (u otros) factores. Además, al analizar la posible localización celular de CCR2, se encontró que este receptor no se expresaría en los astrocitos de NSQ (al

menos en condiciones basales). Tal como mencionamos, en el Capítulo 1 se observó que los cultivos primarios de astrocitos de NSQ son capaces de secretar la quimioquina CCL2 y, como acabamos de mencionar, sería necesaria para la respuesta del reloj a los estímulos inmunes periféricos. CCL2 podría entonces estar actuando directamente sobre las neuronas, activando vías que lleven a cambios en la fase del reloj, o primero a través de la microglía, que a su vez podría secretar factores que lleven a este efecto.



**Figura 3.4.1. Mediadores de la respuesta circadiana a la activación inmune periférica.** Los niveles de los receptores para CCL2 y TNF- $\alpha$  (CCR2 y TNFR1, respectivamente) varían diariamente en los NSQ de ratón. La administración de LPS intraperitoneal lleva al aumento de TNF- $\alpha$  y CCL2 en los NSQ, independientemente del horario de administración. Ambas moléculas participan de la vía que lleva a los retrasos de fase, pero la abundancia de sus receptores impone una ventana horaria para esta respuesta.

Hemos descripto, además, que el bloqueo de la acción de CCL2 no inhibe los cambios de fase en respuesta a un pulso de luz. Esto sugiere que la participación de la quimioquina es específica para la activación de los NSQ en respuesta a estímulos inmunes, y no como parte del mecanismo general de sincronización del reloj. Respecto a la vía de señalización que podría estar mediando la participación de CCL2 en los cambios de fase inducidos por LPS, como ya se mencionó, en respuesta a CCL2, se activan las vías de MAPK, PKC y Calcio-Calmodulina. Todas estas vías han sido descriptas como partícipes del proceso de sincronización fótica del reloj, lo que sugiere que la inducción de CCL2 (que se daría en respuesta a estímulos inmunes y no a estímulos fóticos) provocaría la activación de cascadas de señalización compartidas con la activación por luz, provocando efectos similares en la fase de los ritmos. Esto está sustentado por el hecho de que los efectos de la luz y el LPS sobre la fase del reloj no son aditivos (Marpegán et al. 2005), sugiriendo también una interacción o solapamiento entre ambas vías. La caracterización de las cascadas de señalización activadas en los NSQ en respuesta a LPS daría información acerca de la ruta que media entre la inducción de CCL2 (y TNF- $\alpha$ ) y los cambios de fase (que requieren de la inducción de genes reloj).

En resumen, nuestros resultados muestran que dentro de la interacción que ocurre entre el sistema inmune y el reloj circadiano, la activación inmune periférica es capaz de inducir la producción de moléculas proinflamatorias en los NSQ, aunque la capacidad de responder a los mismos estaría modulada, al menos en partes, por los niveles presentes de sus correspondientes receptores (**Figura 3.4.1**). Además, nuestros resultados muestran también la posible modulación farmacológica de los efectos de la activación inmune sobre el reloj. Como ya se mencionó, diversas enfermedades y modelos de inflamación son capaces de alterar el reloj circadiano y, procesos controlados por este, como el ciclo sueño vigilia (revisado en: Coogan & Wyse 2008). Estas alteraciones están a su vez asociadas a problemas como la fatiga y el *sickness behavior* (Ferguson et al. 2012; Tizard 2008), en las que se ha propuesto un rol para Ccl2 a nivel del SNC (D'Mello & Swain 2014; Vasiadi et al. 2014). Se ha reportado que el Bindarit administrado periféricamente es capaz de inhibir la síntesis de Ccl2 en el CNS (Ge et al. 2012) lo

## CAPÍTULO 2 - DISCUSIÓN

cual abriría la puerta al diseño de tratamientos para mitigar las consecuencias circadianas (y del CNS en general) causadas por enfermedades infecciosas.



## Bibliografía del Capítulo 2

- Adler, M.W. et al., 2005. Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. *The AAPS journal*, 7(4), pp.E865–70.
- Bozek, K. et al., 2009. Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PloS one*, 4(3), p.e4882.
- Chang, H.-C. & Guarente, L., 2013. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell*, 153(7), pp.1448–60.
- Coogan, A.N. & Wyse, C. a, 2008. Neuroimmunology of the circadian clock. *Brain research*, 1232, pp.104–12.
- D'Mello, C. & Swain, M.G., 2014. Liver-brain interactions in inflammatory liver diseases: implications for fatigue and mood disorders. *Brain, behavior, and immunity*, 35, pp.9–20.
- Ferguson, S.A. et al., 2012. The influence of circadian time and sleep dose on subjective fatigue ratings. *Accident; analysis and prevention*, 45 Suppl, pp.50–4.
- Foresti, M.L. et al., 2009. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are increased in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Journal of neuroinflammation*, 6, p.40.
- Van Gassen, K.L.I. et al., 2005. The chemokine CCL2 modulates Ca<sup>2+</sup> dynamics and electrophysiological properties of cultured cerebellar Purkinje neurons. *The European journal of neuroscience*, 21(11), pp.2949–57.
- Ge, S. et al., 2012. The CCL2 synthesis inhibitor bindarit targets cells of the neurovascular unit, and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), p.171.
- Gibbs, J.E. et al., 2012. The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), pp.582–7.
- Gourmala, N.G. et al., 1997. Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *Journal of neuroimmunology*, 74(1-2), pp.35–44.

- Guyon, a et al., 2009. Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience*, 162(4), pp.1072–80.
- Hayashi, M., Shimba, S. & Tezuka, M., 2007. Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 30(4), pp.621–6.
- Khorooshi, R., Babcock, a. a. & Owens, T., 2008. NF- B-Driven STAT2 and CCL2 Expression in Astrocytes in Response to Brain Injury. *The Journal of Immunology*, 181(10), pp.7284–7291.
- Kuboyama, K. et al., 2011. Astrocytic P2Y(1) receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(9), pp.1930–41.
- Leone, M.J. et al., 2012. Role of proinflammatory cytokines on lipopolysaccharide-induced phase shifts in locomotor activity circadian rhythm. *Chronobiology international*, 29(6), pp.715–23.
- Marpegan, L. et al., 2009. Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: correlation with proinflammatory factors. *Chronobiology international*, 26(7), pp.1430–42.
- Marpegán, L. et al., 2005. Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *Journal of neuroimmunology*, 160(1-2), pp.102–9.
- Mora, E. et al., 2012. Bindarit: an anti-inflammatory small molecule that modulates the NFκB pathway. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(1), pp.159–69.
- Nelson, T.E. et al., 2011. Altered hippocampal synaptic transmission in transgenic mice with astrocyte-targeted enhanced CCL2 expression. *Brain, behavior, and immunity*, 25 Suppl 1, pp.S106–19.
- Nguyen, K.D. et al., 2013. Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science (New York, N. Y.)*, 341(6153), pp.1483–8.
- Old, E.A. & Malcangio, M., 2012. Chemokine mediated neuron-glia communication and aberrant signalling in neuropathic pain states. *Current opinion in pharmacology*, 12(1), pp.67–73.
- Paladino, N. et al., 2014. Modulation of mammalian circadian rhythms by tumor necrosis factor-α. *Chronobiology international*, 31(5), pp.668–79.

- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45.
- Ramakers, C. et al., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), pp.62–66.
- Rostène, W., Kitabgi, P. & Parsadaniantz, S.M., 2007. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature reviews. Neuroscience*, 8(11), pp.895–903.
- Sato, S. et al., 2014. A circadian clock gene, *Rev-erba*, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(1), pp.407–17.
- Scheiermann, C. et al., 2012. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity*, 37(2), pp.290–301.
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y. & Frenette, P.S., 2013. Circadian control of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 13(3), pp.190–8.
- Semple, B.D., Kossmann, T. & Morganti-Kossmann, M.C., 2010. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 30(3), pp.459–73.
- Severini, C. et al., 2014. Bindarit, inhibitor of CCL2 synthesis, protects neurons against amyloid- $\beta$ -induced toxicity. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 38(2), pp.281–93.
- Sironi, M. et al., 1999. A small synthetic molecule capable of preferentially inhibiting the production of the CC chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *European cytokine network*, 10(3), pp.437–42.
- Smits, H.A. et al., 2002. Amyloid-beta-induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 127(1-2), pp.160–8.
- Sugimoto, T. et al., 2014. Clock gene *Per1* regulates the production of CCL2 and interleukin-6 through p38, JNK1 and NF- $\kappa$ B activation in spinal astrocytes. *Molecular and cellular neurosciences*, 59, pp.37–46.
- Tanuma, N. et al., 2006. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta neuropathologica*, 112(2), pp.195–204.

- Tei, N. et al., 2013. Expression of MCP-1 and fractalkine on endothelial cells and astrocytes may contribute to the invasion and migration of brain macrophages in ischemic rat brain lesions. *Journal of neuroscience research*, 91(5), pp.681–93.
- Tizard, I., 2008. Sickness behavior, its mechanisms and significance. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 9(1), pp.87–99.
- Ukai-Tadenuma, M. et al., 2011. Delay in feedback repression by cryptochrome 1 is required for circadian clock function. *Cell*, 144(2), pp.268–81.
- Vasiadi, M., Newman, J. & Theoharides, T.C., 2014. Isoflavones inhibit poly(I:C)-induced serum, brain, and skin inflammatory mediators - relevance to chronic fatigue syndrome. *Journal of neuroinflammation*, 11(1), p.168.
- Zhou, Y. et al., 2011. Chemokine CCL2 modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Journal of neurochemistry*, 116(3), pp.406–14.

## Capítulo 3

“Relación entre el reloj circadiano y un modelo murino de glioma hipotalámico”



## 4.1 Introducción

Los gliomas son el tipo más común de tumor cerebral primario y se originan tanto a partir de células gliales como de precursores neuronales, clasificándose en cuatro grados, dependiendo de su malignidad (I – IV). Los pacientes que sufren de un glioma tipo IV (Glioblastoma Multiforme, GBM, que representan el 60 – 70% de incidencia dentro de los gliomas; Wen & Kesari 2008), poseen una media de sobrevida de alrededor de 15 meses, incluso luego de cirugía, y tratamientos de quimio- y radio-terapia. Los GBM, mayoritariamente de origen astrocítico, se caracterizan por una invasividad difusa (lo que dificulta su remoción quirúrgica), proliferación acelerada, vascularización y gran resistencia a la quimio- y radio-terapia convencional. Los pacientes diagnosticados con GBM son tratados comúnmente con Temozolomida (TMZ), aunque la efectividad de la misma no logra sobrepasar en gran medida la sobrevida descripta previamente.

El microambiente que se genera en el entorno de un glioma incluye una desregulación de los niveles y de las funciones de diversas citoquinas y quimioquinas (incluyendo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, y CCL2). Las células tumorales son capaces de secretar estas moléculas, en condiciones que favorecen la angiogénesis y la difusión tumoral. Asimismo, el microambiente tumoral se encuentra poblado de microglía y astrocitos reactivos, que, dependiendo de la etapa de desarrollo del tumor, pueden tener una activación proinflamatoria, o antiinflamatoria (que promueve la progresión de la enfermedad). Si bien en adultos el origen y distribución de los tumores de glía suele darse en regiones cercanas a los nichos de neurogénesis adulta, en pacientes pediátricos hay una incidencia de alrededor del 30% en regiones hipotalámicas y del tracto óptico (Ramanan & Chaseling 2012).

Las características inmuno-desreguladoras de los gliomas, y su incidencia en regiones que comprometen los NSQ convierten a los en un modelo interesante para estudiar los efectos de factores inmunes en el sistema circadiano. Asimismo, dado la importancia de mejorar los esquemas de tratamientos con quimioterapéuticos en

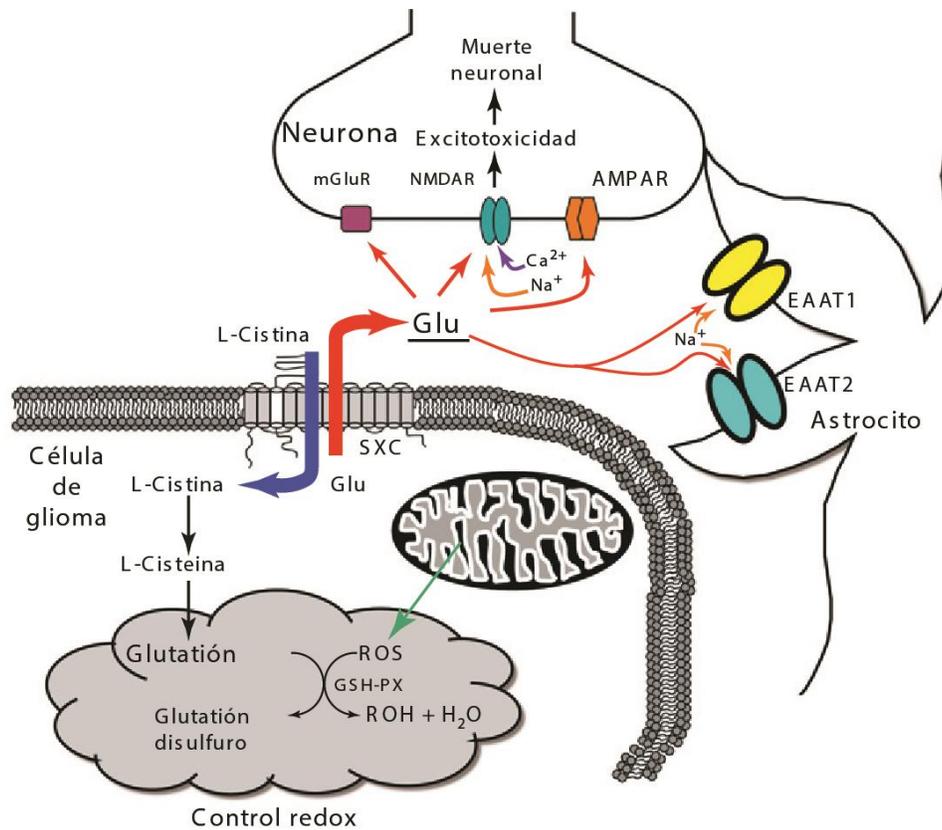
este tipo de tumores, surge la posibilidad de explotar una relación entre el sistema circadiano y los gliomas que provea de una ventana temporal óptima para la misma.

#### **4.1.2 Biología general de los gliomas.**

Como ya se adelantó, los gliomas pueden surgir de células progenitoras neuronales, que persisten en nichos proliferativos en el SNC, tales como la zona subventricular y la zona subgranular (Zong et al. 2012), así como de linajes más diferenciados, incluyendo células NG2, astrocitos, e incluso neuronas maduras (Friedmann-Morvinski et al. 2012). Los gliomas son un tipo de cáncer de gran heterogeneidad, tanto fenotípicamente, como en términos de la expresión génica. Se han identificado un gran número de mutaciones, pero aún ha sido imposible definir un evento único que dé inicio a la enfermedad, aunque se han descrito tres vías que están frecuentemente afectadas: la vía asociada al receptor tirosina quinasa, la vía anti-apoptótica de retinoblastoma (Rb), y la vía de regulación del ciclo celular p53 (Chen et al. 2012). Además en los gliomas, éstas y otras vías pueden verse afectadas por controles epigenéticos, agregando otro nivel de control sobre las funciones celulares de estos tumores. Así, por ejemplo, el estado de metilación del gen O-6-metil-guanina metil transferasa (MGMT), una enzima de reparación de ADN asociada a la resistencia a agentes quimioterapéuticos en GBM, correlaciona con la respuesta del paciente al tratamiento con temozolomida, con mejores respuestas en aquellos en los que el gen se encuentra epigenéticamente silenciado (Miller & Perry 2007).

A pesar de las diferencias genéticas, epigenéticas y del tipo celular de origen, todos los gliomas malignos comparten una característica conservada: la invasividad agresiva. Sorprendentemente, a diferencia de otros tumores sólidos los gliomas malignos no requieren de la metástasis linfática o intravascular para dispersarse; estas células migran activamente a través del espacio extracelular del cerebro, muchas veces siguiendo la microvasculatura, lo que lleva a la formación de tumores satélite distantes del sitio de origen (Cuddapah et al. 2014).

El hecho de que el crecimiento tumoral de los gliomas se encuentre restringido por el cráneo, lleva a que el tumor comience a destruir células nativas del cerebro para crear espacio para la expansión. Uno de los mecanismos que utilizan estos tumores para este fin se basa en la desestabilización de la señalización vía glutamato. En el cerebro normal, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio, y es removido del espacio sináptico a través de los transportadores de aminoácidos excitatorios EAAT-1 y -2 presentes en los astrocitos. Esta remoción es importante para asegurar la correcta transmisión glutamatérgica y para evitar la excitotoxicidad debida a la acumulación de glutamato extracelular. Las células de glioma generan un microambiente con elevadas concentraciones de glutamato, tanto por la liberación a través de un sistema antiporter con cistina (la cual es utilizada por el glioma en un mecanismo de protección contra radicales libres), como por silenciamiento de los genes EAAT (Watkins & Sontheimer 2012). De esta manera, son capaces de alterar significativamente el microambiente, favoreciendo la muerte neuronal por excitotoxicidad, y generando espacio para su crecimiento (**Figura 4.1.1**).



**Figura 4.1.1. Las células de glioma producen elevados niveles de glutamato (Glu).** El glutamato es liberado por las células de glioma, y se intercambia por cistina mediante el transportador SXC. La cistina es transformada en glutatión y aporta a la protección contra radicales libres. Las grandes cantidades de glutamato no puede ser removido por los transportadores EAAT-1 y -2 de los astrocitos, y la exposición prolongada al mismo lleva a la muerte neuronal por excitotoxicidad. Adaptado de Watkins & Sontheimer 2012.

#### 4.1.3 El microambiente tumoral: su relación con microglía, astrocitos y células inmunes.

El análisis de biopsias de tejido tumoral de glioma muestra que no sólo está compuesto por células tumorales, sino por una gran cantidad y variedad de células no transformadas. Entre ellas se encuentran microglía (y macrófagos), astrocitos y linfocitos T infiltrados.

*Microglía:* Existe evidencia que sugiere que las funciones inmunes de la microglía localizada en un microambiente de glioma se encuentran suprimidas (Graeber et al.

2002). Las células de glioma producen citoquinas de fenotipo antiinflamatorio (como por ejemplo IL-10), lo que llevaría a la supresión de la activación y proliferación de la microglía. Por lo general la microglía asociada a los tumores cerebrales primarios poseen una morfología activada, pero presentando un fenotipo antiinflamatorio y de soporte de la proliferación e invasión. De hecho, los gliomas tienden a reclutar células de microglía, mediante la secreción de quimioquinas, e inducir las a secretar metaloproteasas de membrana que activan metaloproteasas solubles secretadas por el glioma (Könnecke & Bechmann 2013). Esto conlleva a la degradación de la matriz extracelular, favoreciendo así la invasividad del tumor.

*Astroцитos:* Frecuentemente se observan astroцитos reactivos asociados a células de glioma, y los mismos han sido implicados en la progresión del tumor. Los astroцитos secretan el precursor de metaloproteinasa preMMP2 y del activador de plasminógeno uPA, lo que juega un rol crítico en la invasividad de los gliomas (Le et al. 2003). Además, la capacidad de los astroцитos de producir factores neurotróficos que juegan un rol en la invasividad de células tumorales ha llevado a implicar a este tipo celular en la promoción del crecimiento de gliomas (Hoelzinger et al. 2007).

*Células T infiltradas:* Los gliomas poseen una población importante de linfocitos T infiltrados, y la cantidad de los mismos correlaciona con la malignidad del tumor. El fenotipo de estas células coincide con el tipo T regulatorias, las cuales promueven procesos de tolerancia y ambientes con perfil anti-inflamatorio, lo cual ayuda a la supervivencia y progresión del tumor (Charles et al. 2012).

#### **4.1.4 El microambiente tumoral: rol de las citoquinas y quimioquinas.**

Las células tumorales explotan el ambiente que las rodea a través del reclutamiento de células no-malignas que proveen de los recursos fisiológicos para facilitar la progresión tumoral. Este proceso se logra gracias a la liberación de diversos factores al microambiente tumoral, que incluyen quimioquinas, citoquinas y factores de crecimiento, entre otros. El microambiente generado entonces

favorece la iniciación tumoral, la angiogénesis, la proliferación y la invasión (Pollard 2004). De esta manera, las funciones clásicas de ciertas moléculas, que usualmente promueven la inflamación, se ven alteradas en el microambiente de gliomas, y pueden participar de mecanismos que promuevan la progresión de la enfermedad.

*TNF- $\alpha$* : Tal como se ha descrito, TNF- $\alpha$  posee un rol pro-inflamatorio y pro-apoptótico. Se ha reportado la presencia de TNF- $\alpha$  en muestras de gliomas de pacientes, siendo más abundante en los tumores menos agresivos (Maruno et al. 1997), y se ha postulado que esta citoquina tendría un efecto anti-tumoral mediando la movilización de leucocitos (Zhu et al. 2012). Sin embargo, se ha descrito también que en un entorno de glioma, TNF- $\alpha$  puede llegar a tener efectos de promoción de la formación y desarrollo del tumor, debido a su actividad angiogénica, mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; Ryuto et al. 1996). Las diferencias entre las acciones pro- y anti-tumorales estarían dadas por diferencias en el microambiente tumoral y en las concentraciones de TNF- $\alpha$  (Zhu et al. 2012).

*IL-1 $\beta$* : La microglía es la principal fuente de IL-1 $\beta$  en los gliomas, aunque se ha descrito que las células tumorales también son capaces de sintetizarla (Charles et al. 2012; Yeung et al. 2012). IL-1 $\beta$  es importante tanto para la invasividad, como para la proliferación de los gliomas. La activación de la vía de ERK por IL-1 $\beta$  tienen un importante efecto mitogénico en la línea de glioma humano U373MG, y promueve su proliferación (Meini et al. 2008). La activación por IL-1 $\beta$  de las vías NF $\kappa$ B, p38 MAPK y JNK en células de GBM produce la inducción de VEGF y de esfingosina quinasa-1, promoviendo la invasión, proliferación y, posiblemente, la angiogénesis de las células tumorales (Yoshino et al. 2006; Paugh et al. 2009). De esta manera, la inducción de IL-1 $\beta$  en el microambiente tumoral funcionaría como un recurso de los gliomas para promover el progreso de la enfermedad.

*IL-6*: Tanto la citoquina como su receptor han sido detectados en muestras de tumores primarios de cerebro. La unión de IL-6 a su receptor produce la activación STAT3, lo que promueve la invasividad y la migración en diversas líneas celulares de glioma (Liu et al. 2010) y correlaciona con un incremento en la expresión de

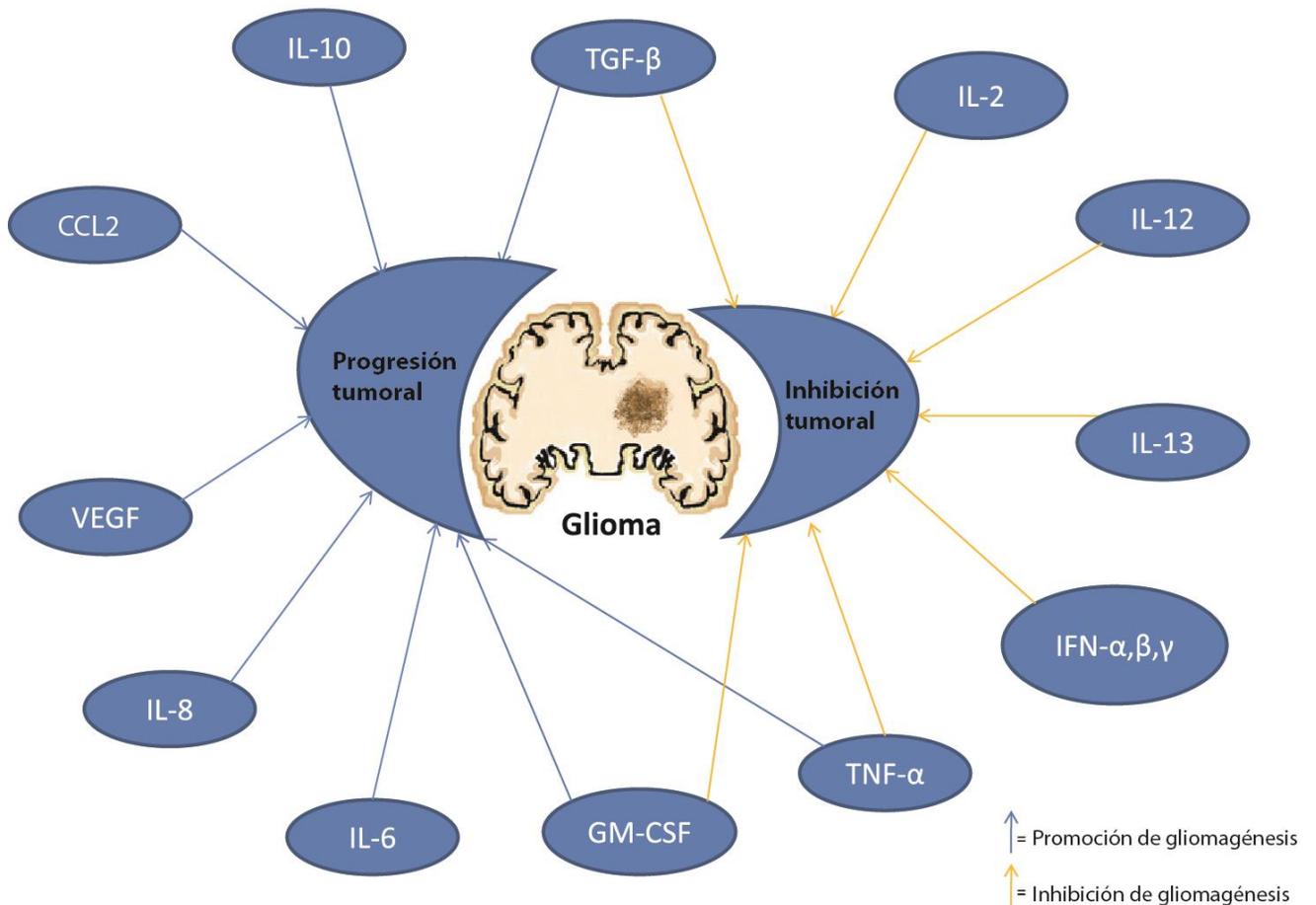
MMP2 (Li et al. 2010). La importancia de IL-6 en la capacidad de invasión y proliferación de gliomas se evidencia en el hecho de la mutación de su receptor en células tumorales redujo su crecimiento y la formación de células *stem* tumorales, llevando a una mayor sobrevida en modelos *in vivo* (Wang et al. 2009).

*IL-8*: Esta citoquina (con actividad quimiotáctica) se expresa y secreta en niveles altos en células de glioma. Se ha descrito que IL-8 estimula autócrinamente el crecimiento de gliomas, y que es capaz de funcionar como quimioattractante de células de GBM (Yeung et al. 2013).

*TGF-β*: La vía de señalización del factor de crecimiento transformante (TGF)-β está involucrada en la proliferación, diferenciación y supervivencia de muchos tipos celulares, incluidas las células de glioma. TGF-β puede contribuir a la patogénesis tumoral promoviendo el crecimiento del tumor, inhibiendo la inmunidad anti-tumoral y favoreciendo la angiogénesis (Kaminska et al. 2013).

*CCL2*: La producción de diversas quimioquinas, entre las que se incluyen CCL2, CCL5, CCL7 y CXCL12 se ha descrito en diversas líneas de glioma, así como en el tejido tumoral de pacientes (Sciumè et al. 2010). En particular, CCL2 es expresada tanto por células de glioma, como por microglía y astrocitos asociados al tumor (Fang et al. 2011; Carrillo-de Sauvage et al. 2012; Yoshimura et al. 1989). El CCL2 secretado promueve el reclutamiento de microglía (que en el entorno tumoral presenta un fenotipo de soporte), linfocitos T regulatorios (Sciumè et al. 2010) e incluso de células precursoras neuronales (Magge et al. 2009).

Además de las moléculas previamente mencionadas, existe un gran número de citoquinas que participan en la regulación del crecimiento tumoral, y que se resumen en la **Figura 4.1.2**. Como se ve, muchas de ellas son utilizadas para promover rutas y mecanismos que benefician el desarrollo del tumor.

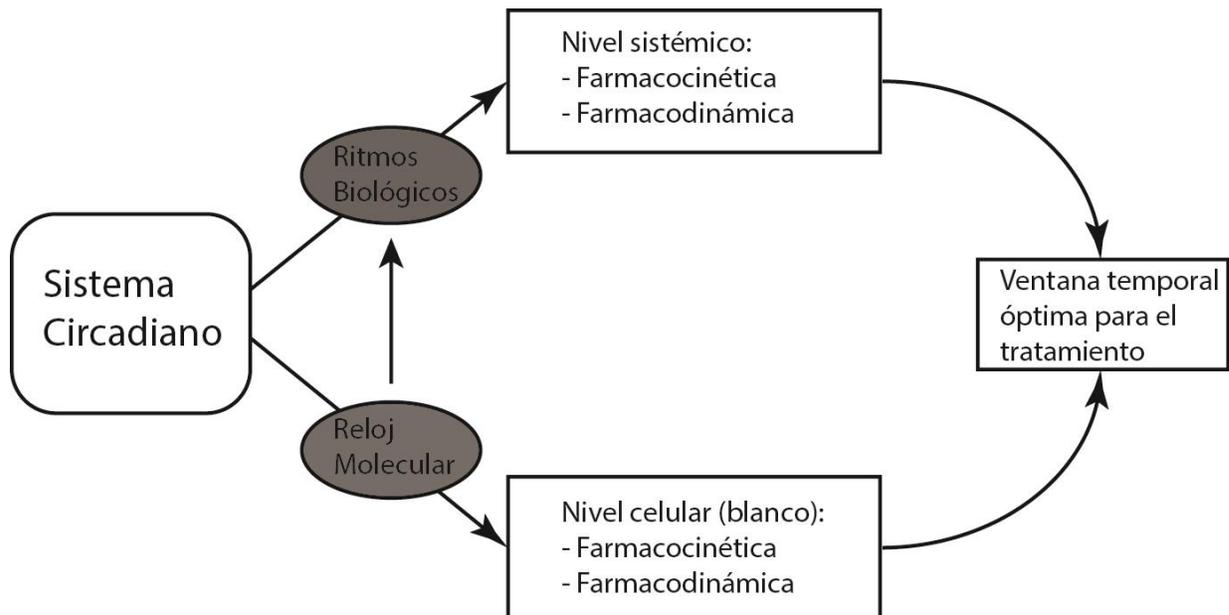


**Figura 4.1.2. Rol de citoquinas y quimioquinas en la progresión tumoral.** En el microambiente tumoral de los gliomas se detectan una gran variedad de moléculas asociadas con la respuesta inmune. En el contexto de este ambiente, las células de glioma favorecen las respuestas permisivas, de proliferación y que faciliten la angiogénesis. Sólo un reducido número de citoquinas poseen una acción netamente antitumoral. Adaptado de Zhu et al. 2012.

#### **4.1.5 La progresión tumoral y el reloj circadiano: relación y enfoques cronoterapéuticos.**

En los últimos años ha cobrado gran importancia el papel del reloj circadiano, tanto en la progresión tumoral como en los beneficios terapéuticos de tratamientos antitumorales cronomodulados. La Organización Mundial de la Salud ha declarado que esquemas de trabajo que implican una desincronización entre el reloj biológico y los factores ambientales (y sociales), tales como el trabajo en turnos rotativos, representan un factor de riesgo en la incidencia de cáncer (Straif et al. 2007). El mecanismo asociado a este fenómeno no se conoce aun completamente, pero se ha descrito en diversos trabajos que la desincronización circadiana altera los niveles de marcadores inflamatorios, altera gravemente el metabolismo y el sistema endócrino, lo que, se cree, favorece el desarrollo del cáncer (Golombek et al. 2013). Además, el crecimiento tumoral puede ser regulado por genes que son parte del reloj circadiano molecular, los cuales se relacionan con el ciclo de división celular, con el sistema de reparación de ADN y con vías pro- y anti-inflamatorias, importantes en la progresión de esta enfermedad (Rana & Mahmood 2010). De hecho, un gran número de estudios clínicos han encontrado una expresión aberrante de genes reloj en diversos tipos de cáncer, que incluyen cáncer de mama, ovarios, próstata, pulmón y piel (Savvidis & Koutsilieris 2012).

Por otro lado, existen estudios que avalan que los tratamientos quimioterapéuticos que tienen en cuenta el momento del día en el cual se aplica la droga, redundan en menores efectos de toxicidad sobre el paciente, así como, en muchos casos, en una mayor efectividad del tratamiento (Innominato et al. 2010). El potencial terapéutico de una quimioterapia cronomodulada se basa en el control que el reloj circadiano tiene tanto sobre los procesos de metabolización de los fármacos, como sobre múltiples procesos celulares (progresión del ciclo celular, apoptosis, reparación del daño al ADN) cuyo estado en la célula blanco es determinante a la hora de determinar la efectividad de un quimioterapéutico a nivel celular (**Figura 4.1.3**).



**Figura 4.1.3 Posibles mecanismos de control circadiano en la respuesta a quimioterapéuticos.** El sistema circadiano puede afectar la respuesta a drogas antitumorales: a nivel sistémico, regulando el metabolismo, la distribución y la toxicidad de la droga, y a nivel de las células blanco, modulando los procesos y mecanismos moleculares afectados por la misma. La conjunción de ambos fenómenos puede producir una ventana temporal óptima para la terapia (cronoterapia). Modificado de Innominato et al. 2010.

A pesar de la gran cantidad de evidencias que muestran una influencia del sistema circadiano sobre el cáncer, las consecuencias del desarrollo tumoral en el funcionamiento del reloj biológico no han sido estudiadas aún. El modelo tumoral de gliomas resulta particularmente interesante para estudiar este último punto, ya que tiene una alta incidencia en la región anatómica que compromete a los NSQ, afecta un tipo celular que modula el funcionamiento del reloj circadiano y altera el perfil de citoquinas y quimioquinas de ambiente. Además, a pesar de los beneficios de las

terapias cronomoduladas, no se ha estudiado aún si este diseño de tratamientos quimioterapéuticos resulta en beneficios a la hora de tratar gliomas.



**Hipótesis y Objetivos del Capítulo 3.**

**Hipótesis particular del Capítulo 3**

*Existe una relación bidireccional entre el sistema circadiano y la progresión de los gliomas hipotalámicos.*

Hipótesis específicas:

- Los gliomas hipotalámicos alteran la capacidad de sincronización del reloj biológico.
- Los gliomas hipotalámicos alteran las características endógenas del oscilador circadiano.
- El reloj circadiano modula la sensibilidad de las células de glioma a la TMZ.

**Objetivo particular del Capítulo 1.**

*Estudiar la relación entre el sistema circadiano y la biología de los gliomas.*

Objetivos específicos:

- Estudiar los efectos de la implantación de gliomas hipotalámicos en la capacidad de sincronización del reloj circadiano.
- Estudiar los efectos de la implantación de gliomas hipotalámicos en las oscilaciones endógenas del reloj circadiano.
- Determinar si las células de glioma son capaces de sostener ritmos circadianos a nivel molecular.
- Evaluar si existe una variación circadiana en la respuesta de las células de glioma al agente terapéutico TMZ.

## Materiales y Métodos

### 4.2.1 Animales

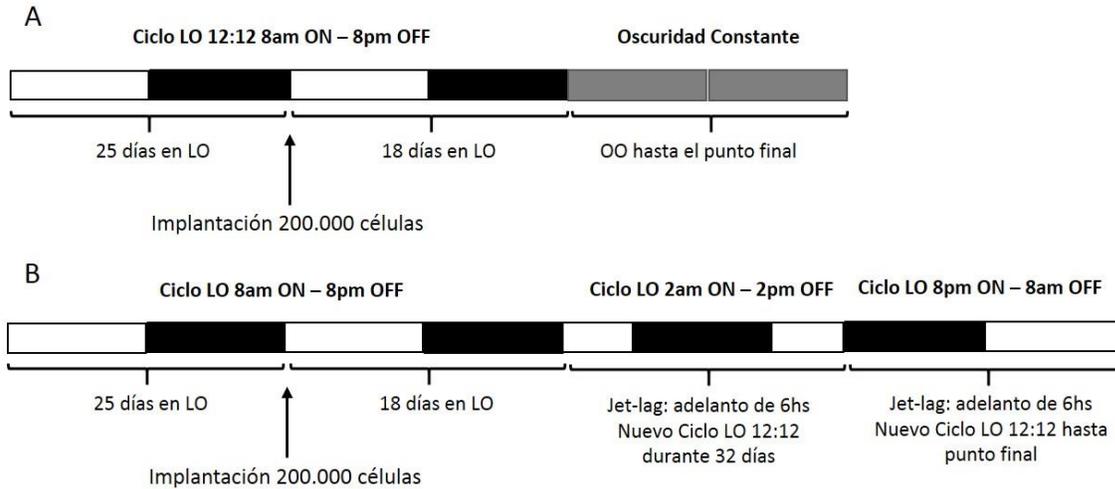
Se utilizaron ratones Nude NIH Swiss – *foxN1* ( $\Delta/\Delta$ ), de 2 meses de edad, adquiridos en el bioterio de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Estos animales no presentan alteraciones circadianas respecto a la cepa Wt (ver **Anexo 1**). Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes bajo un fotoperiodo de luz-oscuridad 12:12 (L:O, excepto que se indique lo contrario), a temperatura constante ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con ventilación controlada estéril y libre acceso a agua y alimento estériles.

#### Registro de actividad locomotora.

Los animales se colocaron en jaulas individuales de acero inoxidable equipadas con sensores infrarrojos de movimiento. Las jaulas, así como el alimento y agua se esterilizaron previo contacto con los animales. Además, el sistema de ventilación de las jaulas se equipó con filtros de  $0,45 \mu\text{m}$ , para disminuir las chances de enfermedad en los animales inmunosuprimidos. La actividad locomotora se registró mediante el sistema de adquisición de datos Archron® versión 2.1, diseñado en nuestro Laboratorio y se recolectaron la cantidad de cuentas cada 5 minutos. Los animales se mantuvieron en condiciones de L:O 12:12, o de O:O, según correspondiese en cada fase del experimento. Las manipulaciones en O:O se realizaron bajo una luz roja ténue ( $<1 \text{ lux}$ ).

El avance abrupto de 6 hs en el esquema de L:O (Jet-lag) se realizó avanzando la hora de apagado de la luz, y acortando la fase de día.

Los esquemas de L:O utilizados, en experimentos independientes, se resumen en la **Figura 4.2.1**.



**Figura 4.2.1. Esquemas de L:O utilizados. A)** Esquema para evaluar la capacidad de sincronización a esquemas de LO y las propiedades circadianas endógenas de los animales. **B)** Esquema para analizar la capacidad de sincronización a ciclos L:O con esquemas más desafiantes (*Jet-lag*).

#### Cirugía de implantación de células.

El procedimiento de implantación de células en los NSQ mediante cirugía estereotáxica se realizó en un flujo vertical de aire estéril. Para proceder con la cirugía, se anestesiaron a los animales con una mezcla de Oxígeno e Isoflurano. Se dispuso a los animales en el marco estereotáxico y procedió a la ubicación de la junta Bregma en la superficie del cráneo. Se implantó 1µl una solución conteniendo 200.000 células/µl en el NSQ izquierdo siguiendo como guía las coordenadas respecto de Bregma: ML= +0,3; AP= -0,1; DV= -5,5, a un caudal de 0,3 µl/min, con una aguja de 33 *gallon* montada a una microjeringa (Hamilton). En el caso de las cirugías control (*sham*) se procedió al descenso de la aguja hasta las coordenadas mencionadas, para luego ser retirada. Durante toda la operación se desinfectaron tanto los materiales como los tejidos con Yodo. Se cerró la herida con sutura discontinua con hilo hipoalérgico auto-absorbente.

Luego de la cirugía, los animales permanecieron en recuperación en jaulas individuales en condiciones de LO 12:12 durante 48 hs y posteriormente se realizó un seguimiento del peso y de parámetros comportamentales. Se consideró una pérdida del 20% del peso desde el momento de la inyección o cambios en el comportamiento normal, como punto de final del experimento.

#### Procesamiento de tejido para tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E).

Una vez alcanzado el punto final, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, se removieron los cerebros y se colocaron en una solución fijadora (paraformaldehído 4% en *Buffer* fosfato 0,1 M a pH 7,4). Se mantuvieron a 4°C hasta el momento de procesamiento.

#### **4.2.2 Tinción de Hematoxilina-Eosina.**

Para realizar la tinción los cerebros fueron embebidos en parafina, se obtuvieron secciones de 4  $\mu\text{m}$  y se montaron en vidrios portaobjetos. A continuación, los cortes fueron desparafinados y se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina. Se comenzó el protocolo con la incubación de los vidrios en agua corriente de 2 a 3 minutos. Luego, se incubó con el colorante Hematoxilina (Biopur, Argentina) por 2 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 2 minutos con agua corriente y un lavado rápido o *dip* con agua destilada. Luego se incubó con una solución ácida (78% de etanol 96% en agua destilada y una gota de ácido clorhídrico) durante 5 minutos y se hicieron 3 *dips* en una solución básica de hidróxido de amonio (420  $\mu\text{l}$  de Hidróxido de amonio 10% en 50 ml de agua destilada). Se realizó un *dip* en agua corriente y un *dip* en Eosina (Biopur, Argentina).

### 4.2.3 Cultivo celular

La línea celular LN-229 fue establecida a partir de células pertenecientes a una paciente de 60 años con un glioblastoma frontal-parieto-occipital de corteza (astrocitoma de grado IV). Son células adherentes que en ensayos *in vivo* en ratones atímicos nude son tumorigénicas. Las células fueron mantenidas en estufa con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C en Medio de cultivo completo: DMEM (Life Technologies) con 10% de SFB (PAA), antibiótico-antimicótico (Life Technologies) y glutamina (Life Technologies). Al llegar a confluencia, las células fueron repicadas tal como se describió previamente.

Para las implantaciones intracraneales las células se despegaron de la botella de cultivo mediante incubación con tripsina-EDTA, se resuspendieron en medio DMEM sin suero, se realizó el recuento, se volvieron a centrifugar, se resuspendieron en un volumen tal de contar con 200.000 células/μl, y se mantuvieron en hielo hasta el momento de su implantación.

#### Transfección.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 35 mm, a una densidad de  $8 \times 10^5$  células/placa. 24 horas más tarde, las células se incubaron por 16 horas con una mezcla de Polietilenimida (PEI):DNA (1,88μl:1μg) utilizando un plásmido que expresa la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor del gen Bmal1.

### 4.2.4 Registro de luminiscencia.

Luego de la transfección con el plásmido Bmal1-luc, se realizó un cambio de medio por DMEM sin rojo fenol, suplementado con buffer HEPES 10 mM (pH 7,2), Glutamina y Antibiótico-antimicótico. Las placas se sellaron con grasa siliconada y se transfirieron a un equipo de registro continuo de bioluminiscencia (Kronos, ATTO, Japón), manteniéndose a 37°C y se registraron los datos en tiempo real de cada *well* durante 1 minuto, con un intervalo de 10 minutos. Para el testeo de la

resincronización mediante cambio de medio completo, las células se retiraron del equipo y se trasladaron a la cabina de flujo laminar, donde se realizó el cambio de medio y finalmente, se las regresó al equipo de registro.

#### **4.2.5 Ensayos con Temozolomida.**

##### Preparación de solución de *stock* de Temozolomida (TMZ).

La TMZ fue obtenida en polvo de Sigma-Aldrich (>98% de pureza, Cat: T2577). La droga fue resuspendida en DMSO hasta alcanzar una concentración final de 164 mM, punto de solubilidad máxima (Gielen et al. 2013).

##### Determinación inicial de IC<sub>50</sub> de TMZ

Se sembraron 2.500 células de la línea LN-229 por *well* en una placa de 96 *wells* con un volumen final de 100 µl de medio de cultivo completo. Luego de 24 horas, se procedió al tratamiento de las células con diferentes soluciones de TMZ en DMSO (en un máximo de 0,6% de DMSO para que el mismo no afecte la viabilidad celular), cuya concentraciones finales por *well* fueron: 1, 10, 50, 100, 250, 500, 1.000, 1500 y 3000 µM. El control del experimento fueron células tratadas con vehículo (DMSO, Veh). Cada condición experimental tuvo 6 réplicas.

A las 72 horas de tratamiento se realizó un cambio de medio por medio de cultivo completo fresco y se agregó Bromuro de tiazolil azul de tetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich) en una concentración final de 10% por *well* y se dejó incubando en estufa a 37° C durante 60 minutos. Luego, se descartó el medio de cultivo, se agregaron 200 µl de DMSO y se mantuvo en agitación unos minutos. Finalmente se registró la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro de placa de 96 *wells*. El ensayo con MTT permite hacer un seguimiento de la actividad metabólica de las células, lo que indica, en el caso de tratamientos quimioterapéuticos, que porcentaje de inhibición del crecimiento produce la droga.

### Determinación del tiempo de tratamiento mínimo efectivo con TMZ

Con el objetivo de hacer una evaluación de un posible tratamiento cronomodulado *in vitro*, se propuso analizar cuánto tiempo de exposición a la droga era necesario para observar un efecto de inhibición de crecimiento. De esta manera se esperaba encontrar un tiempo de tratamiento agudo para ensayos posteriores.

Se sembraron 2.500 células de la línea LN-229 por *well* de una placa de 96 *wells* con un volumen final de 100  $\mu$ l de medio de cultivo completo. Luego de 24 horas, se procedió al tratamiento de las células con una solución de TMZ en DMSO en una dosis de 250  $\mu$ M, que correspondería según la curva dosis-respuesta calculada anteriormente a un 30% de inhibición del crecimiento celular. Cada condición experimental y sus controles tuvieron 6 réplicas. Se procedió a realizar un cambio de medio por medio de cultivo completo fresco a diferentes tiempos de tratamiento: 3, 6, 12, 24 y 72 hs. A las 72 horas del día inicial de tratamiento, se procedió al revelado de absorbancia por el protocolo con MTT.

### Ensayo de cronofarmacología *in vitro*.

Se sembraron 2.500 células de la línea LN-229 por *well* en una placa de 96 *wells* con un volumen final de 100  $\mu$ l de medio de cultivo completo. Luego de 24 horas, se procedió a la sincronización del reloj circadiano molecular de las células con un cambio de medio completo fresco. Se procedió al tratamiento de las células con una dosis de 250  $\mu$ M de la solución de TMZ en DMSO a diferentes horas post-sincronización (HPS), por lo que los tratamientos correspondieron a diferentes horarios de administración en el ciclo circadiano. Se trató a las células a las 0, 6, 12, 18 y 24 HPS. Se dejó a las células en contacto con la droga durante 3 horas (tratamiento agudo) o 72 horas (tratamiento prolongado), para luego cambiar el medio por medio de cultivo completo fresco. Cada condición experimental tuvo 6 réplicas y su control correspondiente con vehículo. A las 72 horas del momento inicial de tratamiento, se procedió al revelado de absorbancia por el protocolo con MTT. Esto mismo fue repetido en los puntos 0 y 12 HPS con diferentes dosis de TMZ (500 – 3000  $\mu$ M).

#### Determinación de ciclo celular.

Se sembraron 400.000 células de la línea LN-229 por *well* en una placa de 6 *wells* en un volumen final de 2 ml de medio de cultivo completo. Luego de 24 horas, se procedió a la sincronización del reloj circadiano molecular de las células con un cambio de medio completo fresco. A 0, 12 y 24 HPS, se estudió la distribución de células en cada fase del ciclo celular por citometría de flujo.

Para ello, las células fueron levantadas a los horarios mencionados, y el *pellet* obtenido luego de la centrifugación fue resuspendido en 100  $\mu$ l de PBS 1% SFB. En un tubo *Falcon* de 15 ml se colocaron 5 ml de la solución fijadora (70% metanol en PBS). Mientras se agitaba la solución fijadora mediante un vortex, se agregaron las suspensiones de células, que fueron fijadas rápidamente. Se incubaron los tubos durante 30 minutos a -20° C. Luego, se añadieron 5 ml de PBS 1% SFB a cada tubo y se agitaron. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos. Se resuspendió el *pellet* de células obtenido, en 2 ml de PBS 1% SFB, para volver a centrifugar de la misma manera. Posteriormente, se resuspendió el *pellet* de células en una mezcla conteniendo: 100  $\mu$ l de PBS 1% SFB, 400  $\mu$ l de Ioduro de propidio (IP) (20  $\mu$ l de IP en 380  $\mu$ l de PBS) y 1  $\mu$ l de RNAasa A. Se incubaron los tubos a 37° C durante 30 minutos y se conservaron a 8° C hasta el análisis. Previo a realizar el pasaje de células por el citómetro, se prepararon los controles de calidad para el ensayo (Kit: DNA QC Particles, Becton Dickinson). Estos fueron utilizados para calibrar el citómetro (BD FACSCalibur, Becton Dickinson). Finalmente, se analizaron las muestras en el equipo, determinando el porcentaje de células en fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M.

#### **4.2.5 Análisis de datos y estadística.**

Los datos se representan como la media  $\pm$  EEM. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con un  $p < 0,05$ .

#### Análisis de ritmos de actividad locomotora.

Las series de datos en *bins* de 5 minutos se analizaron utilizando un programa de análisis para cronobiología denominado El Temps© (A. Díez Noguera, Universidad de Barcelona, España). En condiciones de oscuridad constante (O:O), los períodos de actividad en libre curso ( $\tau$ ) se determinaron utilizando periodogramas de 15 días consecutivos según el modelo de Sokolovel-Bushell (SB). Se realizó además un análisis por *wavelet* con el programa MATLAB© para estudiar la variación diaria de  $\tau$ .

Para el análisis de la distribución de la actividad, se realizaron *waveforms* individuales utilizando 15 días consecutivos en condiciones de L:O y O:O. En condiciones de LO se analizó la actividad, tanto durante el período de luz como durante el período de oscuridad, obteniéndose datos de porcentaje de actividad diurna y porcentaje de actividad nocturna. En condiciones de O:O, se determinó la duración de la noche subjetiva o duración de la fase de actividad ( $\alpha$ ), midiendo el tiempo cubierto por la porción de la curva que sobrepasa la media de actividad, es decir desde el *onset* hasta el *offset*. En cambio, la duración del día subjetivo ( $\rho$ ), se calculó como el tiempo cubierto por la porción de la curva bajo la media de actividad. Fue determinada también la relación  $\alpha/\rho$ . El porcentaje de actividad total durante  $\alpha$  y  $\rho$  se calculó como el porcentaje del área bajo la curva de la *waveform* durante el intervalo correspondiente. Se estudió el cambio de  $\alpha$  y de  $\rho$  a lo largo del experimento a partir de *waveforms* individuales de 5 días consecutivos, abarcando todo el tiempo de O:O.

Para el estudio del ángulo de fase ( $\psi$ ) en ciclos de L:O, se definió el inicio de la fase de actividad (*onset*) como el momento en el cual la curva de actividad supera el valor de actividad media en cada *waveform* individual con una duración de 2 horas. La diferencia entre el *onset* y el momento de apagado de las luces fue considerado el  $\psi$ .

Para el análisis de la variabilidad de los *onsets* se definieron los mismos a partir del actograma de cada animal, y se calculó la diferencia entre el *onset* de cada día y el del día previo. La sumatoria de los valores absolutos de cada diferencia se utilizó como parámetro indicativo de la estabilidad del *onset*.

Para los análisis de agrupamiento de fase (definida como en *onset* de actividad) se utilizó el test de estadística circular de Rayleigh. Se analizaron: las fases promedio individuales de cada animal en L:O y O:O y las diferencias entre las fases promedio agrupadas de L:O y de los primeros días de O:O para cada animal, tanto en animales implantados como en *sham*. Al calcular cada uno de los gráficos de Rayleigh individuales de O:O se ajustó el parámetro de período del gráfico al período endógeno calculado para cada animal, de manera de poder comparar animales con períodos distintos y evitar corrimientos en la fase promedio en O:O debidos a la diferencia entre el período impuesto por el ciclo L:O ( $T$ ) y el período endógeno del animal ( $\tau$ ). Las horas de los gráficos están calculadas para expresar las horas circadianas (Horas CT) y posibilitar la comparación entre los distintos gráficos.

Para calcular los días necesarios para la re-sincronización al nuevo ciclo de LO, luego del Jet-lag, se consideró el momento en el cual el *onset* de actividad alcanzó durante más de 3 días la nueva hora de apagado de luces  $\pm 15$  minutos. Esto se reportó como el número de días necesarios para la re-sincronización para cada animal.

Para el análisis estadístico de los diferentes parámetros se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0©. Se emplearon los siguientes test estadísticos: prueba t de Student, ANOVA de una vía, ANOVA de dos vías, prueba de comparaciones múltiples de Tukey y de Holm-Sidak, según correspondiese.

#### Análisis de ritmos de bioluminiscencia.

Las series de datos en *bins* de 1 minuto, tomadas cada 10 minutos, se analizaron utilizando el programa El Temps© y el programa ChronoStar (Stephan Lorenzen, Institute for Theoretical Biology, Humboldt-University, Germany, cordialmente cedido por Bert Maier), para analizar diversos parámetros circadianos. La señal original fue transformada para quitar la tendencia que pudiese enmascarar las oscilaciones circadianas. Para ello se realizó un ajuste a una función polinomial de grado 7, y la señal original fue dividida por la curva ajustada. Se analizó el período

de las series de datos procesadas de sucesivos días mediante un análisis por periodogramas Lomb-Scargle (LS) para las series de datos.

#### Experimentos con TMZ.

Todos los análisis de este grupo de experimentos se realizaron mediante el *software* GraphPad Prism 6. Para los ensayos de dosis-respuesta se relativizaron la absorbancia de cada *well* tratado con TMZ a la media de la absorbancia de los *wells* con tratados con Veh y se expresó en porcentaje. Los datos fueron analizados mediante un ajuste por regresión no lineal, utilizando un modelo de ajuste para protocolos con drogas de inhibición con respuesta normalizada.

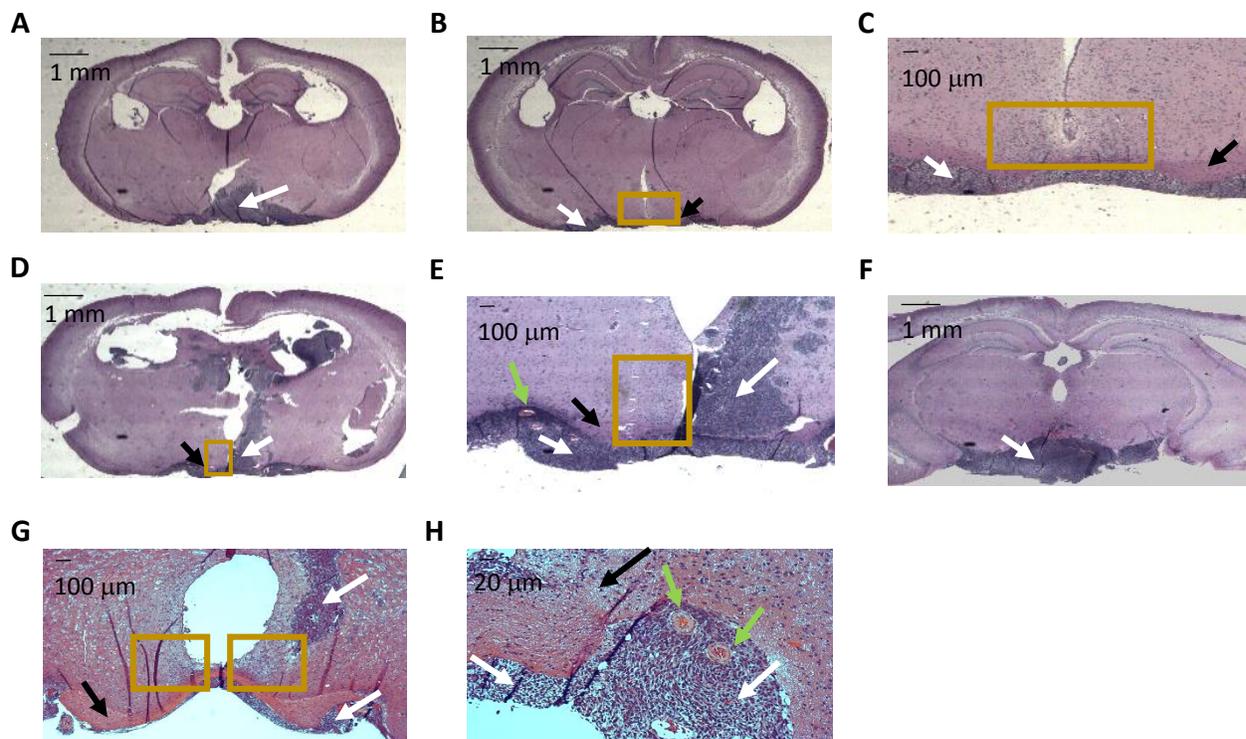
Para el ensayo de determinación de tiempo mínimo efectivo de tratamiento, las diferencias por ANOVA de dos vías seguido de la prueba comparaciones múltiples Holm-Sidak.

Para el análisis entre distintos horarios de administración dentro de cada protocolo de tratamiento (agudo o prolongado), se realizó un ANOVA de dos vías seguido por las pruebas de comparaciones múltiples de Sidak y Tukey, según correspondiese.

### **4.3 Resultados.**

#### **4.3.1 Efectos de la implantación de gliomas hipotalámicos en la sincronización del reloj circadiano.**

Para caracterizar los efectos de los gliomas hipotalámicos en los ritmos circadianos utilizamos como modelo la implantación unilateral de células de la línea LN-229 en el NSQ izquierdo de ratones atímicos. Este modelo produjo un 100% de eficiencia en la generación de tumores post-implantación. Los animales sobrevivieron un promedio de  $54 \pm 4$  días. Los tumores tuvieron una distribución poco homogénea entre distintos animales implantados, con el común denominador de tomar la zona inferior del quiasma óptico, el hipotálamo ipsilateral, y parte de los ventrículos (**Figura 4.3.1**). En algunos animales se observó el desplazamiento del ventrículo debido al crecimiento tumoral (**Figura 4.3.1 A**), así como procesos de vascularización importante (**Figura 4.3.1 B y C**). En los cortes horizontales se puede apreciar el enorme crecimiento tumoral y un alto grado de infiltración en el tejido (**Figura 4.3.1 E y F**)



**Figura 4.3.1. Cortes cerebrales y tinciones HE.** Flechas blancas: tumor. Flechas negras: quiasma óptico. Flechas verdes: vascularización. Recuadros: núcleos supraquiasmáticos (NSQ). **A.** Corte coronal a partir de un animal implantado. **B y C.** Cortes coronales a partir de un animal implantado. **D y E.** Cortes coronales a partir de un animal implantado. **F.** Corte coronal a partir de un animal implantado. **G y H** Cortes coronales a partir de un animal implantado.

Como se mencionó anteriormente, previo y posterior a la implantación de las células, se registró la actividad locomotora de cada animal, en jaulas individuales.

Se analizaron diferentes parámetros que describen la capacidad de sincronización del reloj a ciclos L:O en las distintas etapas del protocolo experimental con ciclos de LO:

- **Anterior a la Implantación (AI):** Se consideró desde el inicio del registro de actividad hasta el día de la implantación.
- **Post-Implantación (PI):** para esta etapa se tuvo en cuenta desde 4 días PI, con el fin de permitir la recuperación post-operatoria, hasta el

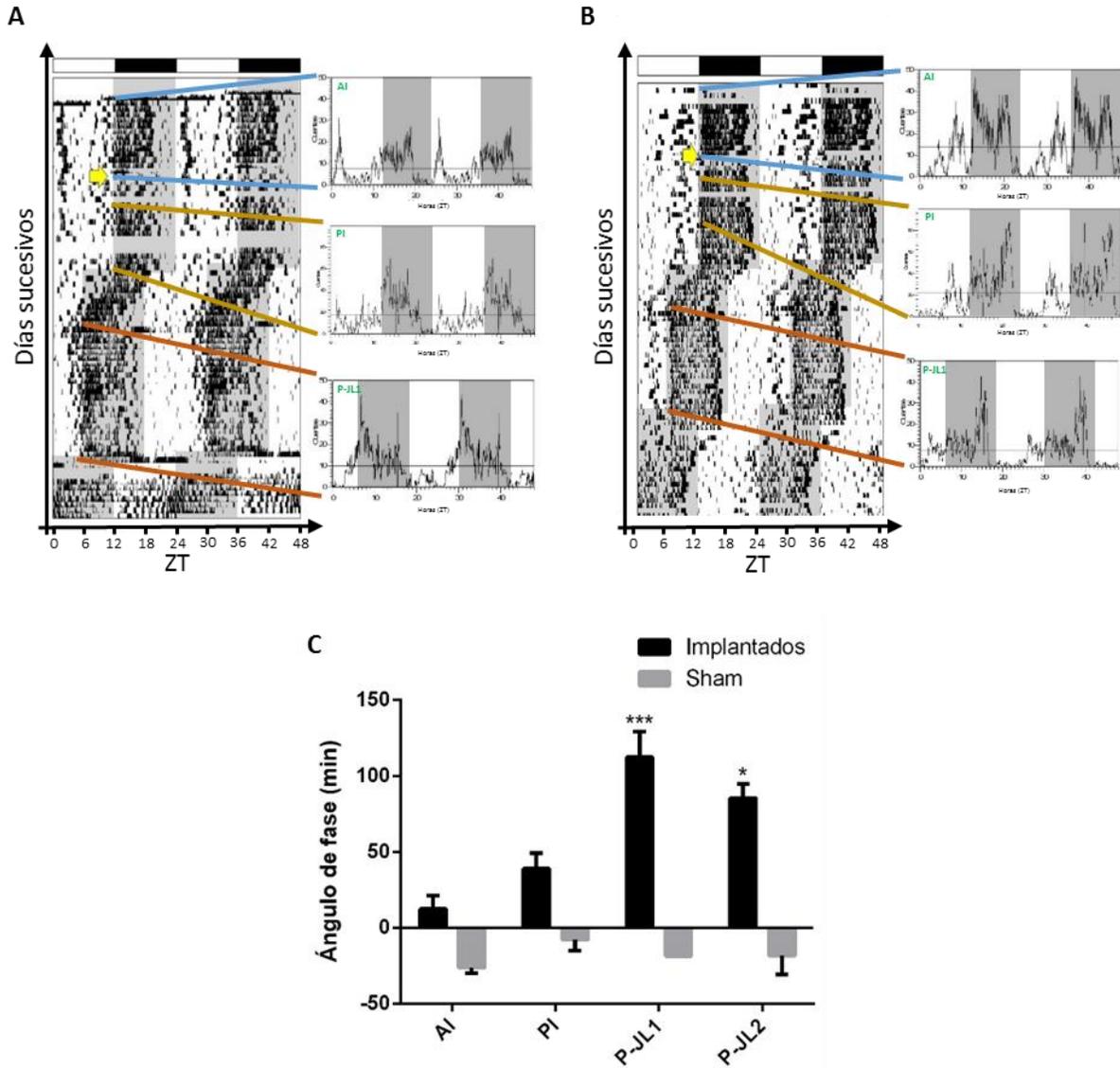
día en que se realizó el primer protocolo de *jet-lag*.

- **Protocolos de *Jet-lag*:** Cada animal tiene una sensibilidad diferente a los cambios bruscos de ciclos de L:O, por lo que la velocidad de resincronización al nuevo ciclo L:O de cada uno de ellos es diferente. **Post *Jet-lag* 1 (P-JL1, al día 19 PI)**, se tuvo en cuenta desde el día en que se consideró sincronizado al nuevo ciclo L:O (2 a.m. ON – 2 p.m. OFF) hasta el día en que comenzó el segundo protocolo de *jet-lag*. **Post *Jet-lag* 2 (P-JL2, al día 51 PI)**, para esta etapa se tuvo en cuenta desde el día de resincronización al nuevo ciclo de L:O (8 p.m. ON – 8 a.m. OFF) hasta el día de punto final de cada animal.

#### *Ángulo de Fase ( $\Delta\psi$ ).*

Se define ángulo de fase como la diferencia entre un marcador de fase endógeno del animal (*onset* de actividad) y una fase correspondiente al Zeitgeber (el apagado de las luces). Para el análisis del ángulo de fase, se utilizaron *waveforms* individuales, las cuales muestran el promedio de actividad de un número de días sucesivos en función de las horas del día (Horas ZT). El *onset* de actividad se definió como el momento en el cual la curva de actividad superó el valor de actividad media en cada *waveform* individual con una duración de 2 horas.

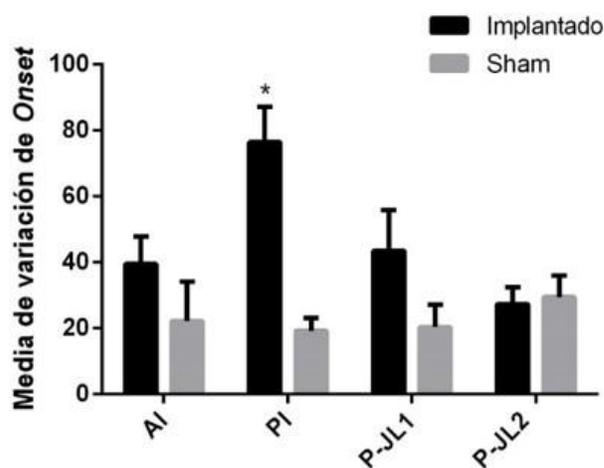
En la **Figura 4.3.2**, se pueden observar los actogramas obtenidos de los registros de un animal implantado (**Fig. 4.3.2 A**) y un control (**Fig. 4.3.2 B**). Se muestra el rango de días utilizado para realizar las *waveforms* promedio de cada etapa y las *waveforms* resultantes. En la **Figura 4.3.2 C** se puede ver una tendencia al aumento del  $\Delta\psi$  luego de la implantación, comparado con los controles *sham*, lo que significa un adelanto del *onset* con respecto del apagado de las luces, significativamente mayor en las etapas P-JL1 y P-JL2 [ANOVA de dos vías y test de comparaciones múltiples de Sidak para el factor Tratamiento. AI, PI,  $p > 0,05$  (implantados,  $n = 6$ ; *sham*,  $n = 3$ ); P-JL1,  $p < 0,001$  (implantados,  $n = 6$ , *sham*,  $n = 3$ ); P-JL2  $p < 0,05$  (implantados,  $n = 2$ , *sham*,  $n = 3$ )].



**Figura 4.3.2. Cambios en el ángulo de fase ( $\Delta\psi$ ) en ratones implantados con gliomas hipotalámicos. A.** Actograma de animal implantado. Waveforms de cada etapa: Anterior a la implantación (AI), Post-Implantación (PI), Post-*Jet-lag* 1 (P-JL1). Cada *waveform* se muestra doblemente graficada para una mejor visualización. **B.** Actograma de animal control (*sham*). Waveforms de cada etapa: AI, PI y P-JL1. **C.** Se muestran los resultados del análisis del  $\Delta\psi$  (minutos) para ambos grupos en cada etapa del protocolo. Valores positivos representan adelantos en el *onset* respecto del apagado de las luces.

*Estabilidad del onset de actividad*

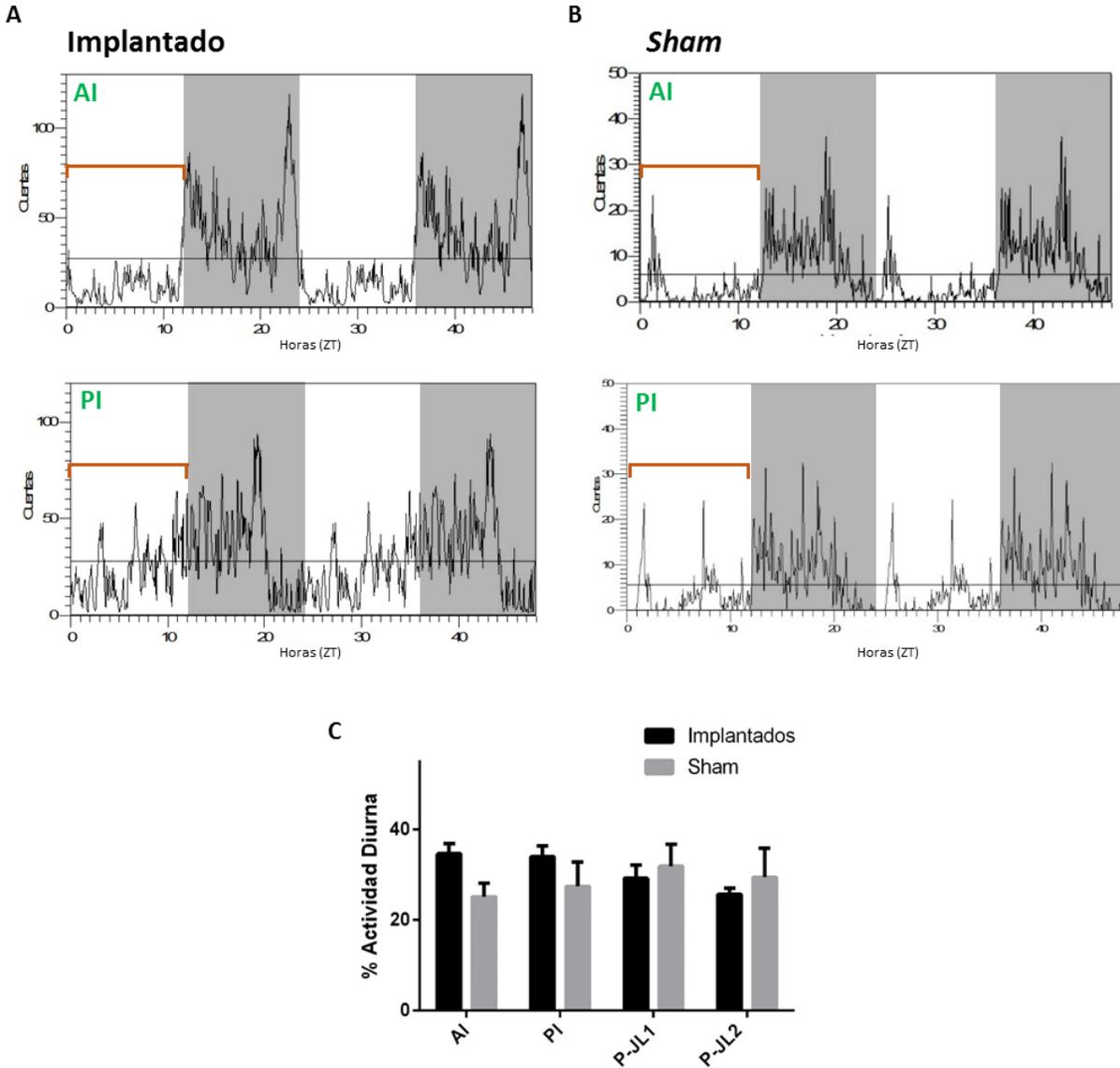
Habiendo elegido al *onset* de actividad como la fase endógena característica del animal, se analizó la variación diaria del mismo. Para ello, se calculó el *onset* de actividad de cada día con *waveforms* diarias y un análisis seriado. Se calculó la diferencia entre el *onset* de un día y el día anterior, y se promediaron los valores absolutos de dichas diferencias, teniendo como resultado la media de variación del *onset* de actividad para cada animal en cada etapa del protocolo experimental. En la **Figura 4.3.3** se puede ver que hay un aumento de la media de variación del *onset* de actividad, o hay mayor inestabilidad del mismo, luego de la implantación, pero que a medida que sigue avanzando la enfermedad se va estabilizando progresivamente. (Análisis de ANOVA de dos vías  $p < 0,05$  para factor tratamiento,  $p > 0,05$  para factor tiempo e interacción; prueba a posteriori de Sidak para el factor Tratamiento: PI,  $p < 0,05$ ; AI, P-JL1 y P-JL2,  $p > 0,05$ ; AI, PI y P-JL1: implantados,  $n = 6$ , *sham*,  $n = 3$ ; P-JL2: implantados,  $n = 2$ , *sham*,  $n = 3$ ).



**Figura 4.3.3. Cambios en la estabilidad del *onset* de actividad en ratones implantados con gliomas hipotalámicos.** Se muestra la media de variación de *onset* diaria. Se muestran los datos de ambos grupos (Implantados vs. *Sham*) en cada etapa del protocolo experimental: AI, PI, P-JL1, P-JL2.

*Distribución de la actividad diurna.*

Para continuar describiendo los efectos de los gliomas hipotalámicos sobre los ritmos diarios, se estudió si existían diferencias entre el porcentaje de actividad que ocurría durante la fase de luz, respecto de la actividad total de cada animal. Este parámetro se midió a partir de *waveforms* de ciclos LO en cada etapa del protocolo. En mayor detalle, se cuantificó la actividad desde ZT 0 hasta ZT 12 del ciclo (fase de luz), midiendo el área bajo esta porción de la curva de la *waveform* y finalmente, la actividad diurna fue relativizada a la actividad total de esa etapa en particular. Este análisis no arrojó indicio de alguna diferencia entre los grupos implantados y controles en ninguna de las etapas estudiadas (**Figura 4.3.6**; ANOVA de dos vías:  $p > 0.05$  en ambos factores AI, PI y P-JL1: implantados,  $n = 6$ , *sham*,  $n = 3$ ; P-JL2: implantados,  $n = 2$ , *sham*,  $n = 3$ ).



**Figura 4.3.6. Análisis del porcentaje de actividad diurna en ciclos de L:O. A.** Waveforms de las etapas AI y PI de un animal implantado. Se indica el fragmento de la curva que fue analizado (ZT 0 a ZT 12). **B.** Waveforms de las etapas AI y PI de un animal control. **C.** Se muestran los datos de % de actividad diurna de ambos grupos (implantados vs. sham) para cada etapa del protocolo.

### Sincronización al ciclo LO

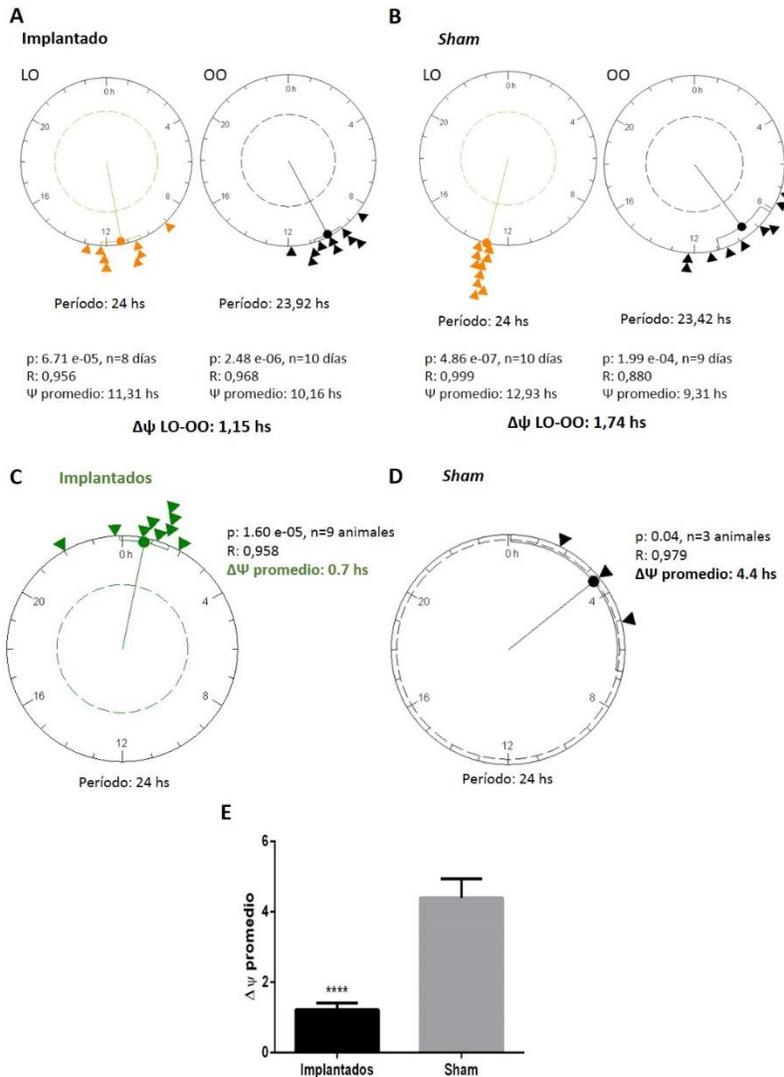
Se estudió la capacidad de sincronización al ciclo de L:O, analizando la diferencia entre la fase de la actividad locomotora de los primeros días de O:O, y la de los días

previos en L:O mediante gráficos de Rayleigh. Estos gráficos permiten visualizar el agrupamiento de las fases de distintos animales (y determinar su significancia estadística). Si un animal se encuentra sincronizado al ciclo L:O, se espera que la fase en estas condiciones pueda predecir la que el animal tendrá en los primeros días de O:O. En particular, se compararon los agrupamientos de la fase promedio entre cada grupo en L:O y la fase promedio en los primeros días de O:O (**Figura 4.3.5 A y B**), y luego se agruparon las diferencias entre las fases promedio en L:O y O:O para cada animal y se compararon animales implantados y *sham* (**Figura 4.3.5 C y D**). Todos los análisis de Rayleigh mostraron agrupamientos significativos, para todos los casos analizados.

Se encontró que los animales *sham* poseen un mayor agrupamiento de fases en ciclos de L:O (**Figura 4.3.5 A, B, Izquierda**). Al contrario, al observar los gráficos de Rayleigh de los ciclos de oscuridad constante (**Figura 4.3.5 A, B, Derecha**), se encontró que los animales implantados tienen una mejor agrupación de los *onsets* diarios, dando una mayor significancia (y menor error estándar) de la fase promedio, así como que su fase promedio es más cercana al comienzo de la noche subjetiva (CT 12).

Habiendo determinado la diferencia de fase entre L:O y O:O de cada animal, se utilizó cada dato individual como información de entrada para un nuevo gráfico de Rayleigh de cada grupo experimental (implantados vs. *sham*). Se puede ver que la distribución de las  $\Delta\psi$  L:O-O:O tiene una mayor agrupación en el grupo de animales implantados (**Figura 4.3.5 C**) que para el grupo control (**Figura 4.3.5 D**). El agrupamiento de diferencias de fase L:O-O:O promedio para ambos grupos de animales fue significativo y, las diferencias entre ambos se analizaron mediante una prueba t de Student. Se encontró que el grupo de animales implantados tiene una menor  $\Delta\psi$  L:O-O:O que el grupo de animales control (**Figura 4.3.5 E**,  $p < 0,001$ , Implantados:  $n = 9$ , Sham:  $n = 3$ ).

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS

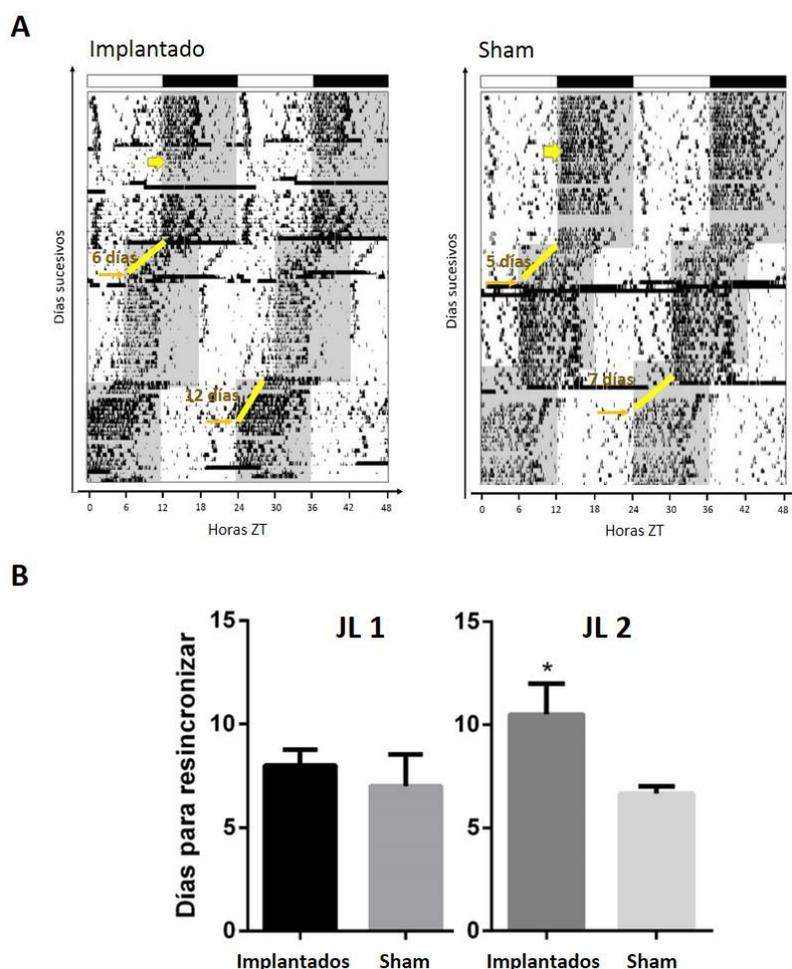


**Figura 4.3.5. Efectos de los gliomas hipotalámicos en la sincronización a ciclos L:O.** **A) y B)** gráficos de Rayleigh para las fases promedio en L:O y O:O en animales implantados y *sham*. El período de cada gráfico se aclaró debajo del mismo. Se informan los p valor, y  $R^2$  de los ajustes de Rayleigh, así como el valor del agrupamiento de las fases ( $\Psi$  promedio) para cada análisis. Se calculó la diferencia entre la fase arrojada por el ajuste de Rayleigh entre L:O y O:O para cada grupo ( $\Delta\Psi$ ). **C) y D)** gráficos de Rayleigh para las diferencias de fases entre L:O y O:O para cada grupo de animales. Se informan los p valor, y  $R^2$  de los ajustes de

Rayleigh, y las diferencias de fase promedio ( $\Delta\psi$  promedio) de cada análisis. **E)** Comparación mediante prueba t de Student entre las  $\Delta\psi$  de cada grupo de animales.

*Resincronización a cambios abruptos en el ciclo L:O (Jet-lag).*

Para profundizar el análisis de los efectos de los gliomas hipotalámicos en la capacidad de sincronización del reloj se estudió la capacidad del mismo de responder a cambios abruptos en el ciclo L:O, utilizando un modelo de Jet-lag por adelanto. Se sometió a los animales a dos protocolos de Jet-lag por adelanto de 6 horas cada uno, separados por 32 días. De esta manera se buscó analizar la capacidad de resincronización en dos etapas diferentes de la progresión tumoral, el primer Jet-lag se realizó a los 19 días PI, y el segundo a los 51 días PI, momento en el que los tumores se encuentran muy desarrollados.



**Figura 4.3.6. Resincronización a protocolo de *Jet-lag*.** **A)** Ejemplos de actogramas y cuantificación de días para la resincronización a cada uno de los dos protocolos de *jet-lag*, en animales implantados (Izq.) y animales *sham* (Der.). Las flechas amarillas indican el momento de implantación. Las líneas amarillas indican los días que se tuvieron en cuenta para la cuantificación, finalizando en los días indicados por las flechas naranjas. Se especifican los días cuantificados para cada caso. **B)** Los animales implantados tienen una resincronización más lenta al Jet-lag por adelanto, realizado 51 días PI.

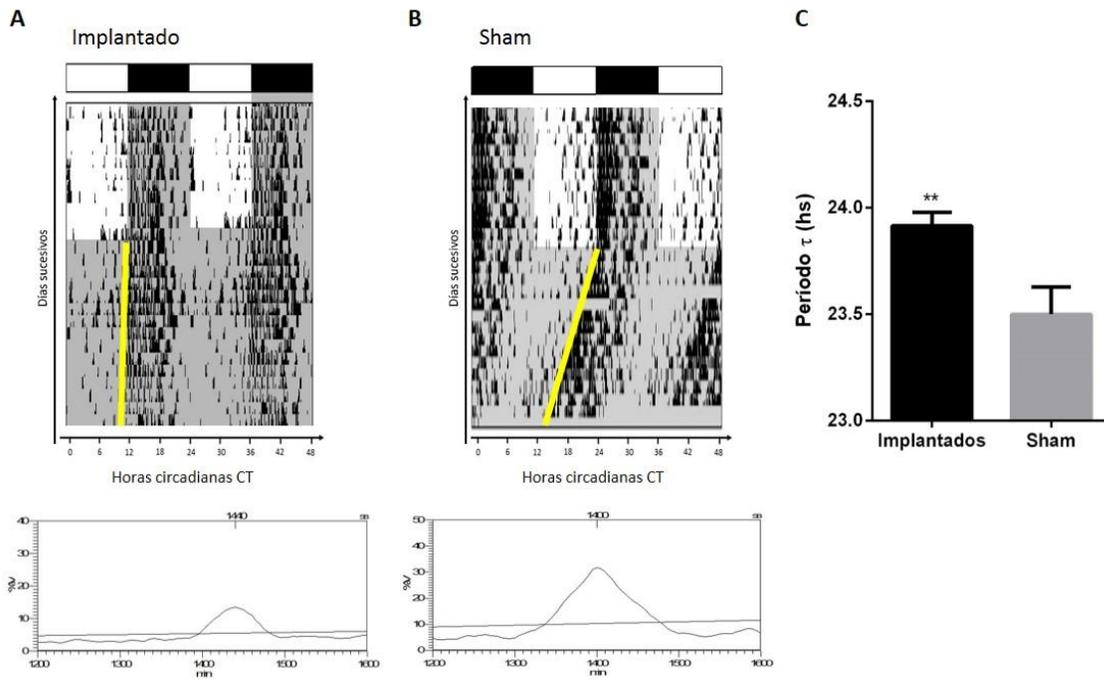
No se encontraron diferencias en la capacidad de resincronización en el primer protocolo de jet-lag (JL1), es decir, ambos grupos tuvieron la misma velocidad de resincronización. Al analizar el segundo jet-lag (JL2) se encontró que los animales implantados tienen una resincronización más lenta demorando más tiempo en adaptarse al nuevo ciclo L:O [Figura 4.3.6; prueba de Student. JL1:  $p > 0,05$ , implantados ( $n = 6$ ) vs. *sham* ( $n = 3$ ). JL2:  $p < 0,05$ , implantados ( $n = 2$ ) vs. *sham* ( $n = 3$ )].

#### 4.3.2 Efectos de la implantación de gliomas hipotalámicos en los parámetros endógenos del oscilador circadiano.

Se realizó un análisis de los parámetros circadianos en condiciones OO, para evaluar si la presencia de tumores hipotalámicos tiene efectos en las características endógenas del reloj.

##### *Período endógeno ( $\tau$ )*

Uno de los parámetros más importantes para el estudio de los ritmos biológicos es el período de la variable, que en este caso refleja el período controlado por los NSQ del animal sobre una variable comportamental de salida (la actividad locomotora). Se determinó  $\tau$  para cada animal, dentro de los dos grupos experimentales (implantados y *sham*) mediante periodogramas Sokolove-Bushell (SB) de todos los días de O:O. Se encontró que los animales implantados tienen un período significativamente mayor a los animales control, siendo de  $23,92 \pm 0,06$  hs para el grupo implantados y  $23,50 \pm 0,12$  hs para el grupo *sham* (Figura 4.3.7, prueba de Student,  $p < 0,01$ ; implantados:  $n = 9$ ; *Sham*:  $n = 3$ ).

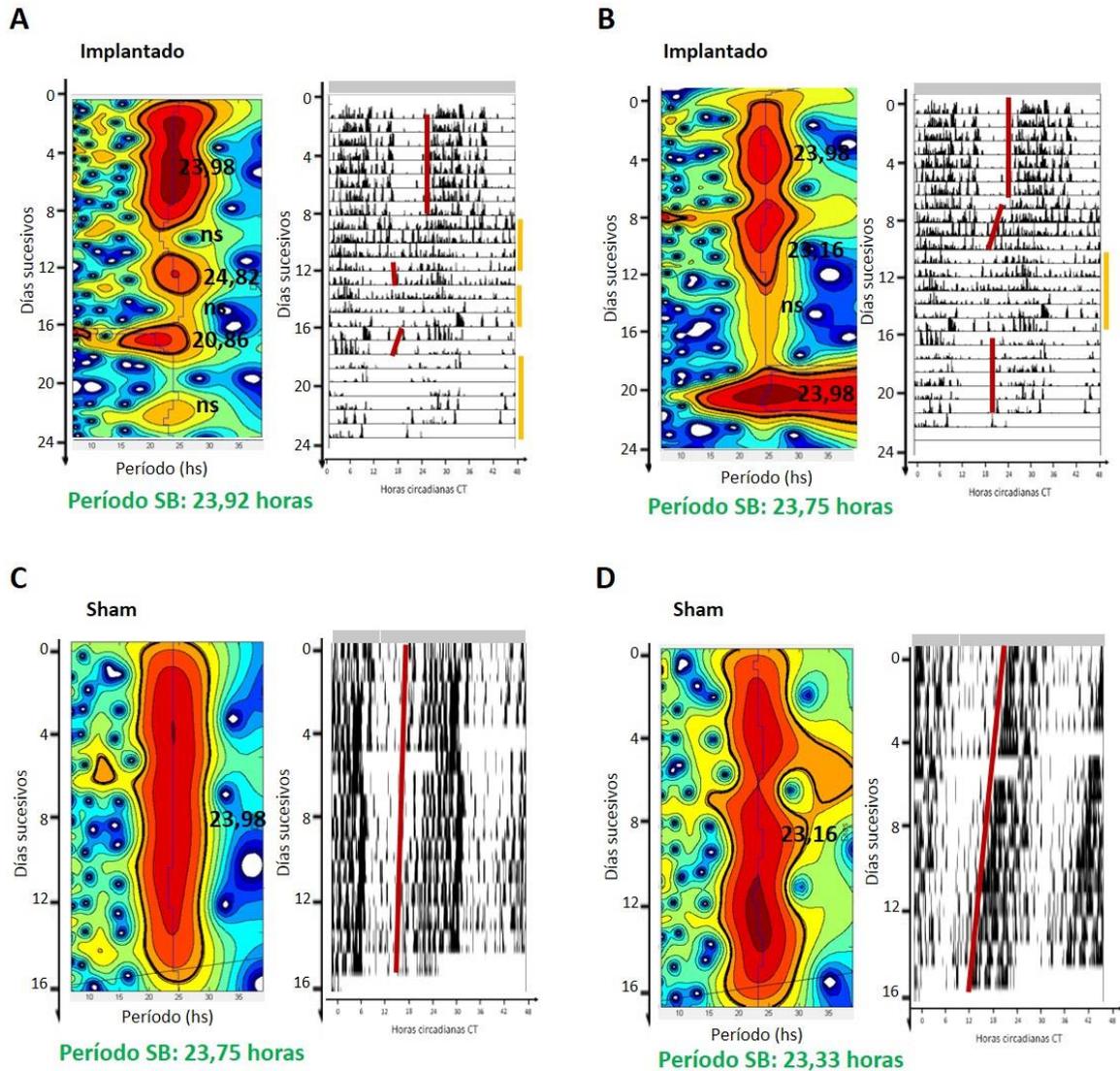


**Figura 4.3.7. A)** Actograma representativo de un animal implantado, en condiciones de O:O. La línea amarilla muestra los días analizados en el periodograma SB inferior. Período significativo: 1440 minutos (24 hs). **B)** Actograma representativo de un animal *sham*, en condiciones de O:O. La línea amarilla muestra los días analizados en el periodograma SB inferior. Período significativo: 1400 minutos (23,33 hs). **C)** Los animales implantados presentaron un período significativamente mayor al grupo control.

*Estabilidad del período endógeno.*

Al observar con detenimiento los actogramas de animales implantados en condiciones de O:O, se encontró que el período endógeno sufría variaciones a lo largo de los días sucesivos. Para obtener datos estadísticos que fundamentaran nuestras observaciones utilizamos la transformada de wavelet que puede calcular períodos instantáneos a lo largo de una serie temporal (varios días). En la **Figura**

**4.3.8** pueden observarse algunos ejemplos de este análisis. Se muestran gráficos tipo *heatmap* para los distintos períodos encontrados a lo largo de los días, a partir del registro de actividad locomotora de los animales. Se encontró que los animales implantados presentan períodos significativos fragmentados y sus valores son alternantes a lo largo de los días. Esto no ocurre en los gráficos de los animales *sham*, en los cuales se observa una estabilidad mucho mayor en el período de máxima significancia.



**Figura 4.3.8** Estabilidad del período en O:O. *Heatmaps* de períodos a lo largo de los días sucesivos y actogramas correspondientes.

**Figura 4.3.8 (Continuación)** En los *heatmaps* se demarca con una línea fina el período instantáneo de máxima significancia a lo largo del tiempo. Se informa el período global de cada ejemplo, analizado mediante periodograma de Sokolove-Bushel. En los actogramas se dibujan con líneas rojas los períodos significativos y con líneas naranjas los no significativos. **A) y B)** Ejemplos de períodos analizados por *wavelet* (izquierda) y actogramas (derecha) correspondientes en animales implantados. **C) y D)** Ejemplos de períodos analizados por *wavelet* (izquierda) y actogramas (derecha) correspondientes en animales *sham*. Se observa que los animales implantados poseen períodos de mayor variabilidad a lo largo de los días de registro.

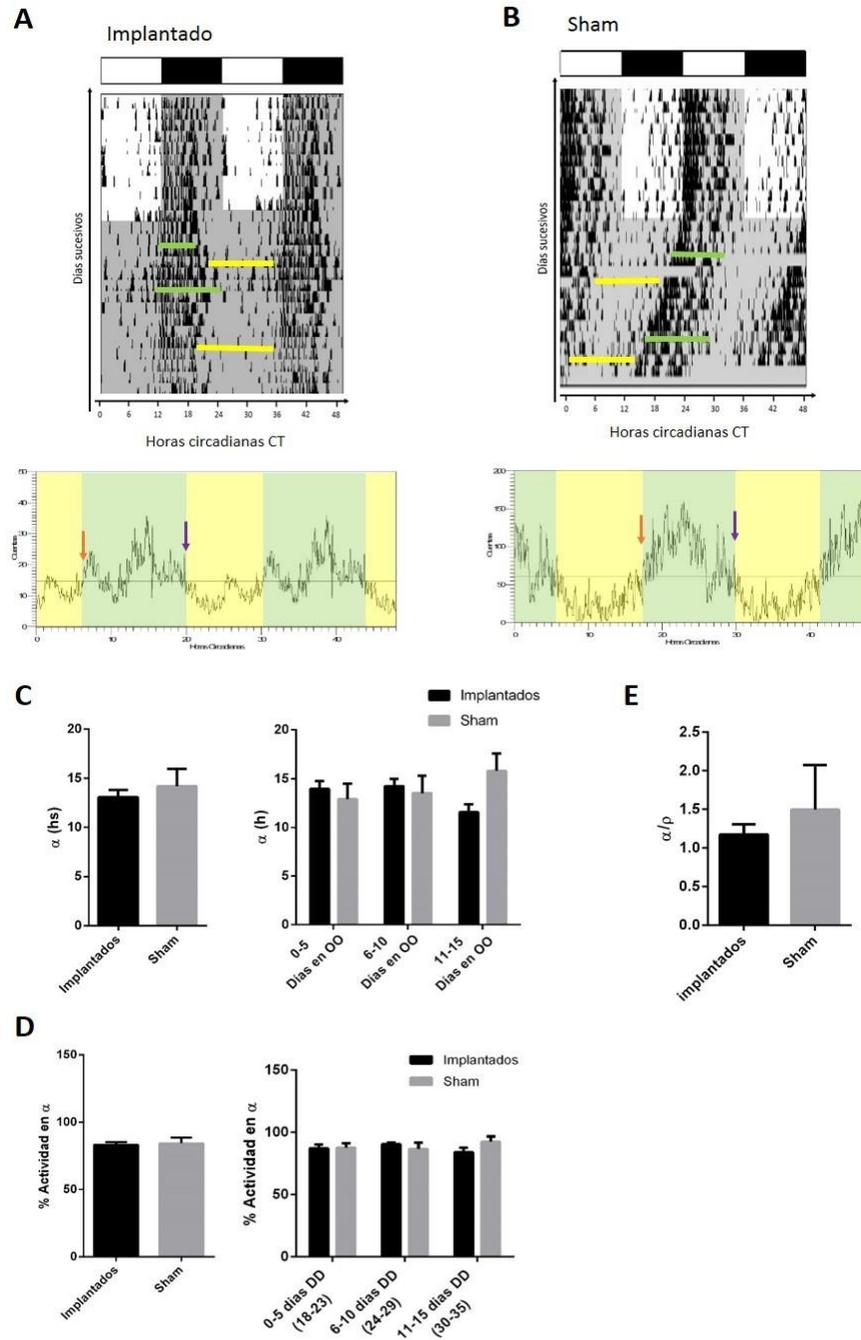
#### *Distribución de actividad en O:O.*

Tal como se analizó en ciclos de L:O, la distribución de actividad también fue evaluada en condiciones de oscuridad constante. En particular, se estudiaron los siguientes parámetros: duración de la noche subjetiva ( $\alpha$ ), duración del día subjetivo ( $\rho$ ), porcentaje de actividad en  $\alpha$  respecto de la actividad total, y la relación  $\alpha/\rho$  para cada uno de los grupos experimentales. También se analizaron los cambios de estos parámetros a lo largo de los días en O:O, tomando de a 5 días consecutivos. Los datos fueron determinados a partir de *waveforms* en O:O. A partir de las **Figuras 4.3.9 A y B** se puede extraer el análisis realizado y explicado anteriormente. Se observan actogramas representando parte de los ciclos LO y el pasaje a OO, y como se define a partir de una *waveform* el onset y el offset de actividad, los cuales determinan los parámetros mencionados.

Al analizar los resultados obtenidos, se pudo ver que la actividad de ambos grupos se concentró en un pico de actividad condensado, y que la duración de la noche subjetiva fue igual para los animales implantados y controles (**Figura 4.3.9 C, izquierda**; prueba t de Student;  $p > 0,05$ ; implantados  $n = 9$ , *sham*  $n = 3$ ). Además, al analizar el mismo parámetro agrupando cada 5 días (de modo de ver si había cambios a lo largo de la permanencia del animal en O:O) tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos ni a lo largo de los días para un mismo

grupo (**Figura 4.3.9 C**, **derecha** ANOVA de dos vías de medidas repetidas,  $p > 0,05$  para ambos factores; implantados  $n = 9$ , *sham*  $n = 3$ ). Asimismo, no se encontraron diferencias entre los animales implantados y controles en cuanto al porcentaje de actividad que ocurrió en  $\alpha$ , en ninguno de los análisis planteados (análisis completo en OO y fragmentado de a 5 días), como se puede ver en la **Figura 4.3.9 D** (prueba t de Student y ANOVA de dos vías de medidas repetidas;  $p > 0,05$  en ambos análisis, para todos los factores; implantados  $n = 9$ , *sham*  $n = 3$ ). Esto indica nuevamente que los picos de actividad se encuentran muy agrupados y condensados en la noche subjetiva, llegando al 80% de la actividad aproximadamente durante  $\alpha$  y que esto no difiere entre animales implantados y *sham*. Por último, al analizar la relación entre la duración de la noche subjetiva y del día subjetivo ( $\alpha/p$ ), tampoco se encontraron diferencias entre los grupos (**Figura 4.3.9 E**, prueba t de Student,  $p > 0,05$ , implantados  $n = 9$ , *sham*  $n = 3$ ).

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS



**Figura 4.3.9. Distribución de la actividad en condiciones de O:O. A) y B)** Actogramas representativos de ciclo de L:O y O:O de un animal implantado (A) y de un control (B). Las líneas verdes determinan la duración de la noche subjetiva ( $\alpha$ ) y las amarillas el día subjetivo ( $\rho$ ).

**Figura 4.3.9 (continuación)** Cada fase del ciclo O:O, se encuentra representada en la *waveform* inferior.  $\alpha$  se considera desde el *onset* de actividad (flecha roja) hasta el *offset* (flecha violeta).  $\rho$  va desde el *offset* hasta el *onset*. **C)** Análisis de  $\alpha$  en horas para grupos Implantados y *sham*. Izquierda: Análisis de todo protocolo experimental en O:O. Derecha: Análisis fragmentado de a 5 días consecutivos, en ambos grupos experimentales. **D)** % Actividad que ocurre en  $\alpha$ . Izquierda: Análisis de todo protocolo experimental en O:O. Derecha: Análisis fragmentado de a 5 días consecutivos, en ambos grupos experimentales. **E)** Relación  $\alpha/\rho$  para los grupos implantados y *sham*, abarcando todo el protocolo en O:O.

En la **Tabla 4.3.1** se resumen los resultados obtenidos respecto de la sincronización a ciclos de L:O, mientras que en la **Tabla 4.3.2** se muestran los referidos a las propiedades endógenas del reloj, en ciclos de O:O.

<b>Sincronización a ciclos de Luz-Oscuridad</b>				
Parámetro		Implantado	Sham	p
<b>Ángulo de Fase <math>\psi</math> * (min)</b>	<b>Anterior a la implantación (AI)</b>	-12,34	-12,03	ns
	<b>Post-Implantación (PI) (0-19 días PI)</b>	-38,98	-90,94	ns
	<b>Post-Jetlag 1 (P-JL1) (26-50 días PI)</b>	-128,45	-48,94	<b>&lt; 0,05</b>
	<b>Post-Jetlag 2 (P-JL2) (59-85 días PI)</b>	-85,42	10,68	<b>&lt; 0,05</b>
<b>Estabilidad del Onset * (min)</b>	<b>AI</b>	39,51	22,25	ns
	<b>PI (0-19 días PI)</b>	76,47	19,26	<b>&lt; 0,05</b>
	<b>P-JL1 (26-50 días PI)</b>	43,58	20,38	ns

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS

	<b>P-JL2</b> (59-85 días PI)	27,39	29,42	ns
Sincronización a ciclos LO † <b>(Diferencia de Fase promedio, horas)</b>		1,21	3,401	<b>&lt; 0,01</b>
% Actividad Diurna *	<b>AI</b>	34,64	25,12	ns
	<b>PI</b> (0-19 días PI)	34,01	27,42	ns
	<b>P-JL1</b> (26-50 días PI)	29,23	31,87	ns
	<b>P-JL2</b> (59-85 días PI)	25,70	29,45	ns
Días para resincronizar a <i>Jet-lag</i> †	<b>JL1</b>	7,83	7,00	ns
	<b>JL2</b>	10,50	6,67	<b>&lt; 0,05</b>

**Tabla 4.3.1. Sincronización fótica.** Resumen de los análisis estadísticos sobre parámetros analizados en condiciones de Luz-Oscuridad. \*, Análisis por ANOVA de dos vías. †, Análisis por prueba t de Student.

<b>Propiedades endógenas en condiciones de Oscuridad Constante</b>			
Parámetro	Implantado	<i>Sham</i>	p
Período Endógeno $\tau$ † <b>(hs)</b>	23,92	23,50	<b>&lt; 0,01</b>
$\alpha$ † <b>(Duración de la noche subjetiva, <math>\alpha</math>)</b>	13,08	14,2	ns
% Actividad en $\alpha$ †	83,31	84,3	ns

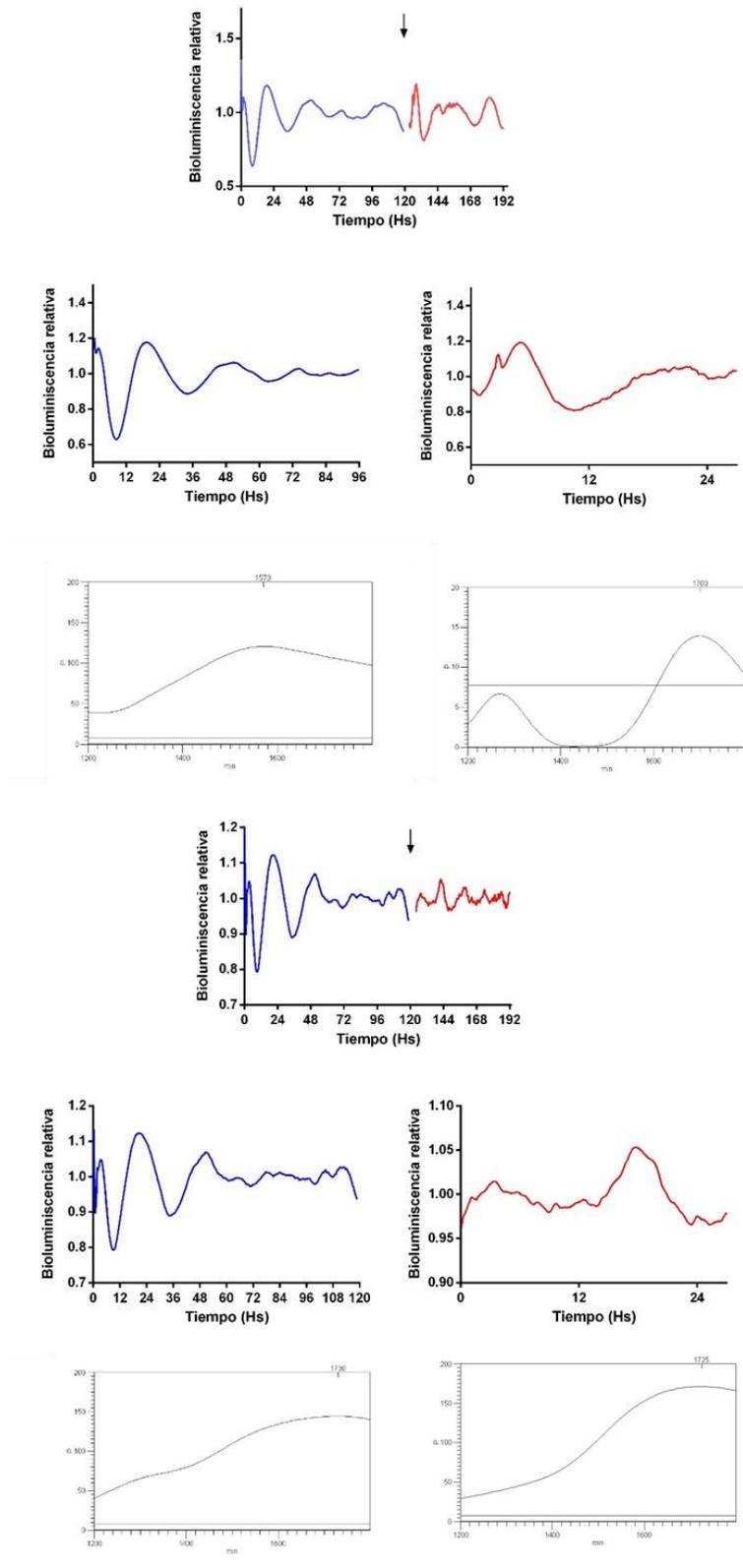
$\alpha/\rho$ † (Duración del día subjetivo, $\rho$ )	1,177	1,497	ns
--	-------	-------	----

**Tabla 4.3.1. Parámetros endógenos del reloj.** Resumen de los análisis estadísticos sobre parámetros analizados en condiciones de Luz-Oscuridad. †, Análisis por prueba t de Student.

#### 4.3.3 Ritmos circadianos en la respuesta a TMZ en la línea LN-229.

##### *Caracterización del reloj circadiano de la línea LN-229.*

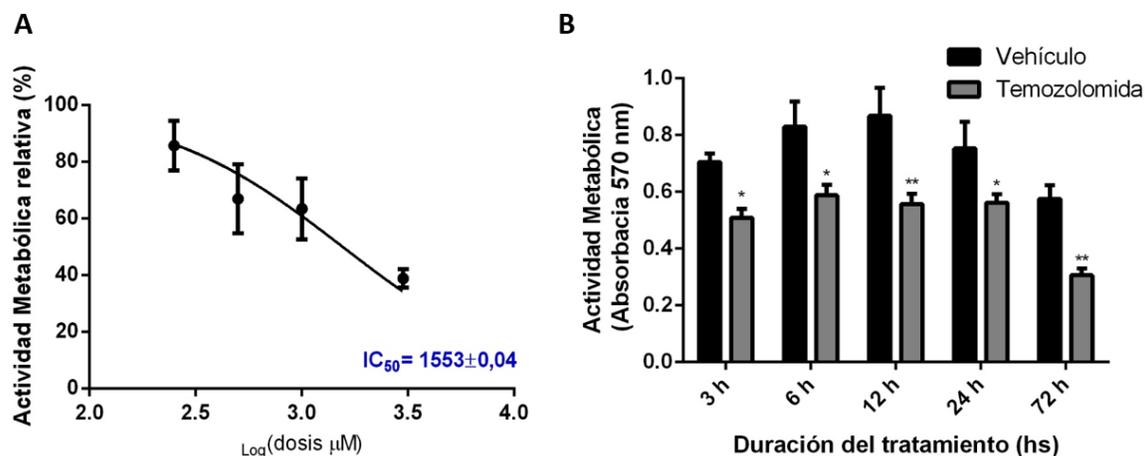
Para realizar un estudio sobre la ritmicidad en la respuesta de las células de glioma a un agente quimioterapéutico, primero nos abocamos a discernir si estas células poseen un reloj molecular sincronizable. Células de la línea LN-229 transfectadas con un constructo Bmal1-luc presentaron oscilaciones circadianas en los niveles de bioluminiscencia, que perduraron entre 2 - 3 días (**Figura 4.3.10**). En los primeros días de registro, las células presentaron un período de entre 26 - 28 horas, que se perdió por *damping* luego de 3 días de registro. Se testeó entonces la posibilidad de resincronizar los cultivos mediante un cambio de completo de medio, el cual es capaz de resincronizar diversos tipos celulares, incluyendo astrocitos (Nagoshi et al. 2005, Capítulo 1 de la presente tesis). Se encontró que el cambio de medio fue capaz de reiniciar las oscilaciones en la expresión de Bmal1-luc, con un período circadiano (**Figura 4.3.10**). Cabe destacar que antes de colocar las células en registro, las mismas también reciben un cambio de medio, con lo que la ritmicidad observada al principio se debe probablemente también a este factor sincronizador.



**Figura 4.3.10. Ritmos circadianos en la línea de glioma LN-229.** Se muestran dos ejemplos representativos de cultivos de células LN-229 transfectados con un plásmido Bmal1-luc. Se muestra el registro de bioluminiscencia y el efecto de un cambio de medio luego de que los ritmos se perdieran por damping (primera fila, flecha). En la segunda fila de cada ejemplo se muestran en detalle los ritmos antes y después de la resincronización. En la tercera fila se muestran los periodogramas correspondientes a cada etapa.

*Variaciones circadianas en la acción de TMZ.*

Una vez comprobado que la línea LN-229 posee un reloj circadiano funcional estudiamos la sensibilidad a TMZ en esta línea y su variación circadiana. Se realizó una curva dosis-respuesta, de donde se eligió utilizar la concentración que produce un 30% de inhibición (250  $\mu$ M, **Figura 4.3.11 A**, ajuste no lineal de curvas de inhibición). Asimismo, se testeó el tiempo mínimo de tratamiento requerido para alcanzar inhibición con esta dosis, encontrándose que ya a las 3 horas de tratamiento una inhibición del 30% (**Figura 4.3.11 B**, ANOVA de dos vías  $p < 0,05$  para factor duración,  $p < 0,0001$  para factor tratamiento,  $p > 0,05$  para la interacción; seguido de prueba de Sidak para el factor Tratamiento: 3 hs,  $p < 0,05$ ; 6 hs,  $p < 0,05$ ; 12 hs,  $p < 0,01$ ; 24 hs,  $p < 0,05$ ; 72 hs,  $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ).

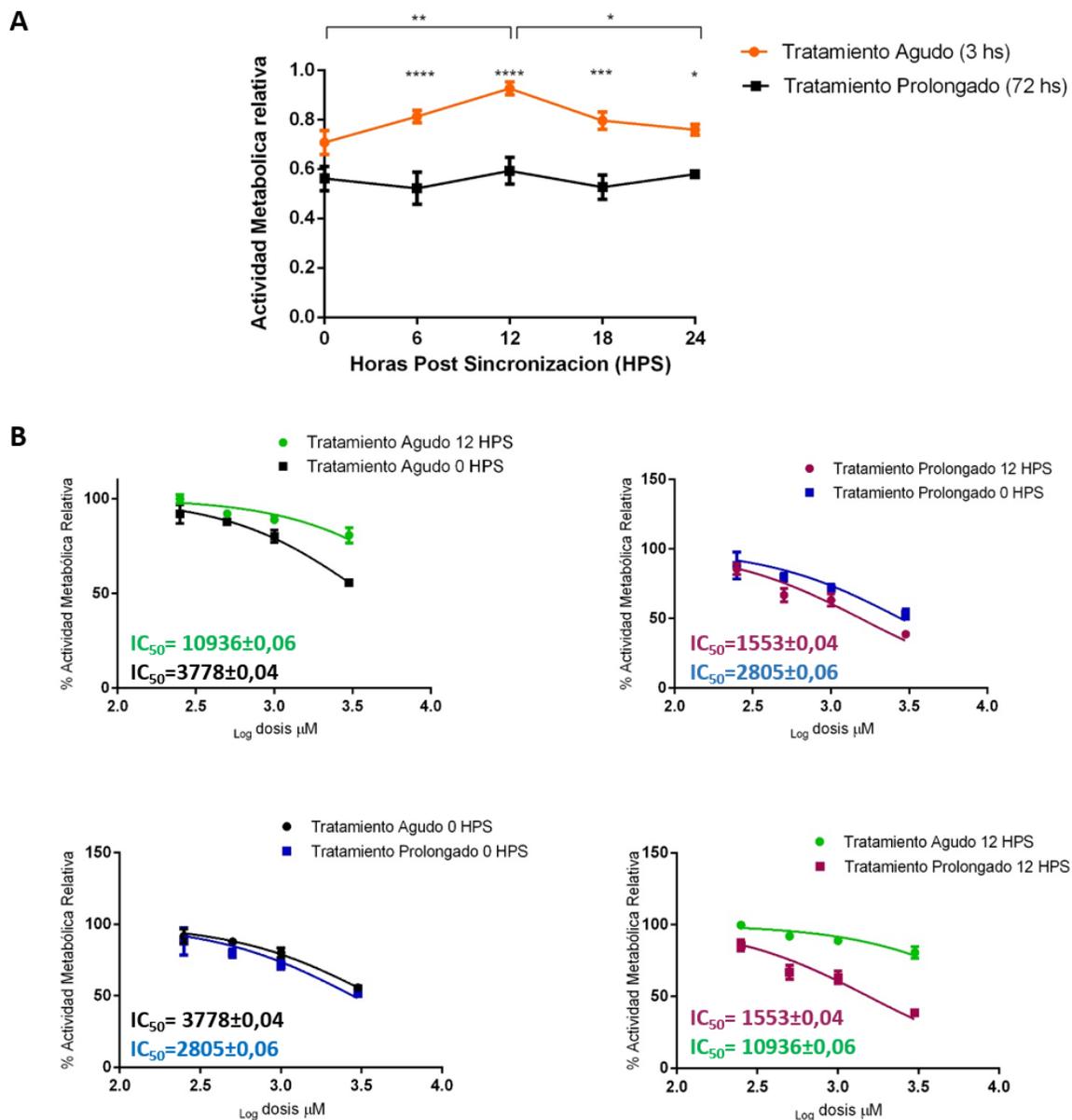


**Figura 4.3.11. Puesta a punto de dosis y duración del tratamiento con TMZ. A)** Curva dosis respuesta de TMZ en células LN-229. El eje vertical indica la actividad metabólica relativa al control para cada dosis. La línea representa un ajuste no lineal a los datos, de donde se calcula la dosis  $IC_{50}$ . **B)** Efectos de la duración del tratamiento con TMZ en células LN-229. El eje vertical muestra la actividad metabólica respecto al control de células sin tratar (sin TMZ ni Veh).

Para analizar si existía una variación circadiana en la eficacia de la TMZ, el reloj circadiano molecular de las células LN-229 fue sincronizado mediante un cambio

completo de medio, y la droga se aplicó 0, 6, 12, 18 y 24 hs post-sincronización (HPS). Encontramos que la máxima eficacia del tratamiento corto (3 hs) ocurre si la droga se aplica 0 o 24 HPS, mientras que para el tratamiento de 72 hs no se observaron diferencias entre los tratamientos a distintas HPS. A su vez, el tratamiento prolongado demostró ser más efectivo que el corto, aunque estas diferencias fueron menores en los horarios de mayor eficacia del tratamiento corto. (**Figura 4.3.12 A**; ANOVA de dos vías;  $p < 0,05$  para el factor horario de tratamiento,  $p < 0,001$  para el factor duración de tratamiento,  $p > 0,05$  para la interacción; comparación a posteriori entre horarios de tratamiento por prueba de Tukey: 0 HPS vs. 12 HPS,  $p < 0,01$ ; 12 HPS vs. 24 HPS,  $p < 0,05$  para tratamiento agudo,  $p > 0,05$  para los contrastes en tratamiento prolongado; comparación a posteriori entre duración de tratamiento por prueba de Holm-Sidak: 0 HPS, ns; 6 HPS,  $p < 0,0001$ ; 12 HPS,  $p < 0,0001$ ; 18 HPS,  $p < 0,001$ ; 24 HPS,  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ). También analizamos, en los puntos de 0 y 12 HPS, qué ocurría a diferentes dosis de TMZ. Encontramos que el tratamiento corto a 0 HPS fue significativamente más efectivo que a 12 HPS, y que comparando con el tratamiento de 72 hs, las células que recibieron TMZ a 0 HPS mostraron igual efecto antiproliferativo en ambas duraciones de tratamiento (**Figura 4.3.12 B**). A su vez, se encontró una diferencia entre los tratamientos de 72 hs realizados a 0 y 12 HPS, sólo que en este caso, la fase más efectiva fue a 12 HPS.

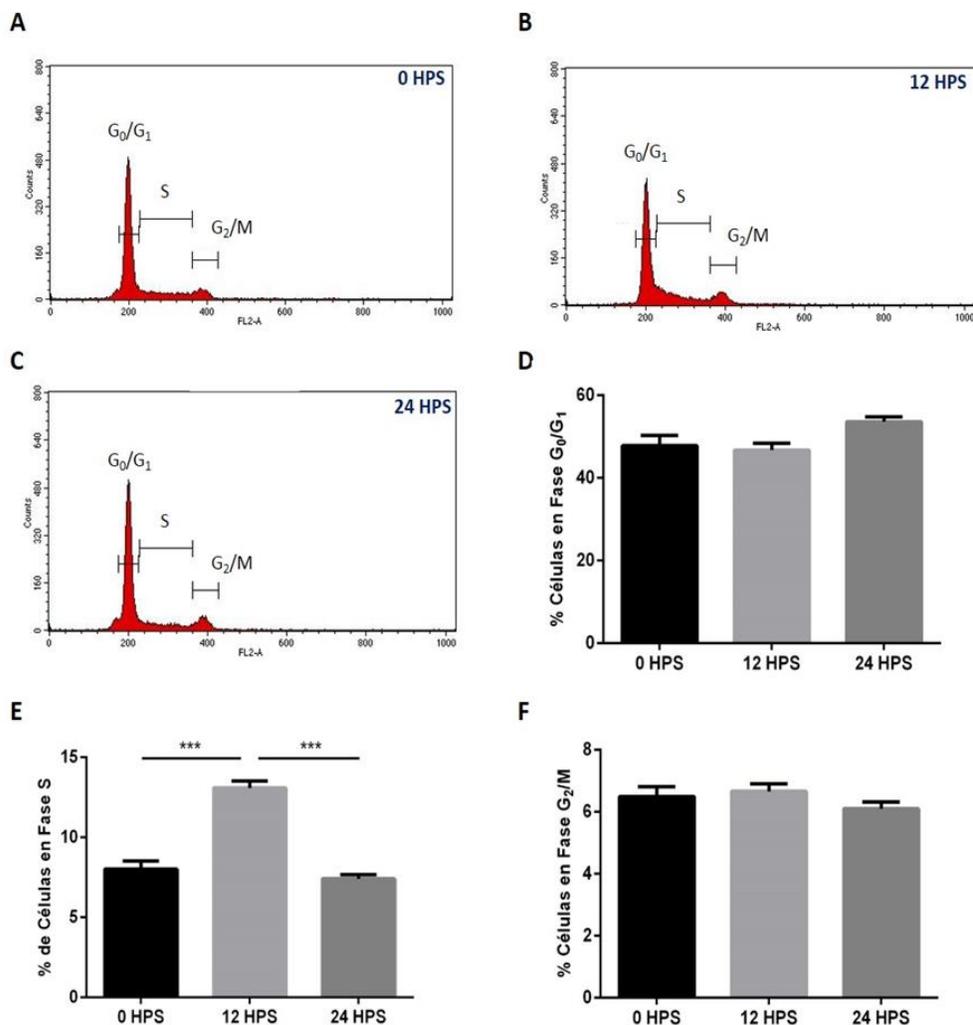
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS



**Figura 4.3.12. Control circadiano en la sensibilidad de las células LN-229 a TMZ.** Los ejes verticales representan la actividad metabólica relativa al vehículo. **A)** La eficacia de TMZ para inhibir la proliferación de células LN-229 depende de la fase circadiana en la que se aplica la droga, en tratamientos de 3 hs. **B)** Curvas dosis-respuesta a 0 y 12 HPS para tratamiento agudo (3 hs) y prolongado (72 hs).

Finalmente, analizamos si existía además alguna variación en el porcentaje de células en distintas fases del ciclo celular, en cada HPS. Encontramos que existe una variación en el porcentaje de células que se encuentran en la fase de síntesis

del ciclo celular, con un 60% más de células en fase S a 12 HPS que a 0 y 24 HPS. El porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>/M no presentó variaciones entre las distintos HPS (**Figura 4.3.13 E**. ANOVA de una vía,  $p < 0,001$ , seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey;  $p < 0,001$  para 12 HPS versus 0 y 24 HPS para el porcentaje de células en fase S;  $p > 0,05$  para el porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>/M;  $n = 5$ )



**Figura 4.3.13. Progresión del ciclo celular post-sincronización del reloj circadiano.** A), B) y C) Histogramas representativos de células LN-229 a 0, 12 y 24 HPS marcadas con Ioduro de propidio para determinar los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular.

**Figura 4.3.13 (Continuación) E)** El porcentaje de células en fase S varía a diferentes HPS del reloj circadiano. **D) y F)** El porcentaje de células en fase fase  $G_0/G_1$  y  $G_2/M$  no presentó variaciones entre las distintos HPS.



#### 4.4 Discusión.

En este capítulo se analizó la relación entre el reloj circadiano y la progresión de gliomas, desde una perspectiva bidireccional. Tal como se describió en la introducción, los gliomas resultan un modelo interesante para el estudio de los efectos de alteración de la homeostasis inmune en el SNC. A su vez, dada la problemática para dar un tratamiento efectivo, el posible control circadiano en la respuesta a drogas quimioterapéuticas proveería de un marco útil a la hora de estudiar posibles terapias cronomoduladas.

##### 4.4.1 Alteraciones circadianas en un modelo de glioma hipotalámico.

La implantación de tumores intracraneales, en la región hipotalámica que contiene a los NSQ provocó alteraciones en los ritmos diarios de actividad locomotora, así como en la capacidad de sincronización del reloj al ciclo L:O. La sincronización debe corregir las diferencias entre la longitud del ciclo externo y el endógeno, lo que produce una relación de fase específica entre ambos. Este proceso puede entenderse, tal como se mencionó en la introducción general, como una combinación de dos mecanismos uno paramétrico, que involucraría cambios en el período endógeno del oscilador, y uno no paramétrico, que se explica por la curva de respuesta de fase (CRF) (Marques 2002).

Nuestros resultados indican que el desarrollo de un tumor en la región hipotalámica produce alteraciones menores en la capacidad del reloj de sincronizarse a ciclos de L:O. Cuando los animales se encontraban en un ciclo L:O estable, se observaron alteraciones en el ángulo de fase y en la estabilidad de la relación de fase entre el *onset* y el ciclo impuesto. Al analizar la estabilidad del *onset* en períodos de L:O, se encontró que durante los primeros días PI, los animales implantados poseen una mayor dispersión del inicio de actividad locomotora, aunque estas diferencias se pierdan con el correr de los días (**Figura 4.3.3**). Este fenómeno podría deberse a una menor robustez del oscilador (en términos de estabilidad de  $\tau$  o de inestabilidad en la amplitud y duración de la CRF) o de su

capacidad de acoplarse a las variables de salida, lo que generaría diferencias entre la relación de fase que establece el reloj con el *zeitgeber* (y/o con el *output*) día a día. Los animales implantados mostraron también un adelantamiento generalizado de su ángulo de fase ( $\psi$ ) con el correr de los días post-implantación (PI, **Figura 4.3.2**), principalmente entre los días 19 y 51 (P-JL1). Este resultado podría indicar que la sincronización diaria a cada ciclo L:O no llega a ser completa en los animales implantados, lo que produciría un adelanto en el onset. Cabe recalcar que, durante el período de tiempo analizado para calcular  $\psi$ , los animales fueron sometidos a un protocolo de jet-lag por adelanto de 6 hs. Si bien para el cálculo de  $\psi$  sólo se tuvieron en cuenta los días en los cuales el animal había completado su resincronización al nuevo esquema L:O, no podemos descartar algún efecto del jet-lag en el ángulo de fase en los animales implantados.

La capacidad de sincronización fue también evaluada comparando las diferencias entre la fase del animal en L:O y la de los primeros días en O:O. Si oscilador se encuentra sincronizado al ciclo L:O, al pasar a condiciones constantes, que permiten analizar la fase endógena del reloj, su fase debiera ser predicha por la que poseía en L:O. Los animales *sham* mostraron una mayor dispersión de fases en O:O y una mayor diferencia entre la fase en O:O y en L:O que los animales implantados (Figura 4.3.5). Esto podría deberse a un proceso de enmascaramiento en los animales control, en el cual la variable de salida esté siendo modulada por el *zeitgeber* en forma directa. El enmascaramiento puede servir como un ajuste fino al proceso de sincronización; a pesar de que no se conoce una estructura anatómica que sustente este mecanismo, se ha hipotetizado que la hojuela intergeniculada del tálamo (Golombek & Rosenstein 2010), y se ha descrito que depende de algunas señales de salida de los NSQ tales como TGF- $\alpha$  (Kramer et al. 2001). Se ha detectado la presencia de TGF- $\alpha$  en glioblastomas humanos en correlación con la capacidad proliferativa de los mismos (Schlegel et al. 1990; von Bossanyi et al. 1998). Esta, u otra señal, alterada por el microambiente del tumor podría cambiar la manera en que el fenómeno de enmascaramiento modula los ritmos de actividad, lo que produciría que los animales implantados posean una menor dispersión de fases al pasar a O:O, y menores diferencias con la fase en L:O.

Se estudió también la capacidad de los animales sincronizados de responder a cambios abruptos en el ciclo L:O. Los animales implantados respondieron de la misma forma que los *sham* a un protocolo de Jet-lag cuando el mismo se realizó a los 18 días PI (**Figura 4.3.6**). Un segundo protocolo de Jet-lag realizado a los 51 días PI mostró que los animales implantados que habían sobrevivido hasta esa etapa del experimento poseían una menor velocidad de resincronización. Al igual que la sincronización continua a un ciclo de L:O que no varía, la resincronización luego de un cambio abrupto depende también de mecanismos paramétricos y no-paramétricos y contaría con la misma base molecular y celular. Por lo tanto, las alteraciones que el glioma produce a la hora de la sincronización a ciclos L:O estables podrían ser también las causales de este fenómeno.

Finalmente, al analizar las características endógenas del reloj circadiano de animales implantados, se encontró que los mismos poseen un período significativamente mayor que los controles (**Figura 4.3.7**). Además, el análisis de la estabilidad del período endógeno mostró que los animales implantados poseen variaciones del mismo a lo largo del transcurso de los días.

Las alteraciones en la sincronización y en los parámetros endógenos deben estudiarse de una forma integrada ya que, como ya se mencionó la sincronización depende de las características endógenas del oscilador. Nuestros resultados apuntan a tres fenómenos importantes en los animales implantados: incremento e inestabilidad de  $\tau$ , inestabilidad de la fase en L:O (junto con una alteración en la relación de fase con el *zeitgeber*) y una posible disminución del fenómeno de enmascaramiento.

El período endógeno del oscilador depende de la velocidad con la que ocurran las oscilaciones moleculares en cada célula así como del acoplamiento entre diferentes células de los NSQ (Welsh et al. 2010). La velocidad del reloj molecular puede modularse mediante la alteración de la transcripción de genes reloj (sea activando vías que lo modulen directamente, o modificando la condensación de la cromatina), por modificaciones post-transcripcionales (por ej. miARNs) o por modificaciones post-traduccionales (por ej. vía caseína kinasas o PKC) sobre los

productos de los mismos, que alteren su estabilidad (Lowrey & Takahashi 2011). Como se describió en la introducción, los gliomas alteran profundamente el ambiente en el que se desarrollan, secretando una gran cantidad de factores, aumentando el número de capilares y reformando la matriz extracelular, entre otros fenómenos. Entre las moléculas que abundan en el entorno de gliomas cabe destacar el glutamato, citoquinas como IL-1 $\beta$ , y la quimioquina CCL2. El glutamato es liberado en respuesta a la luz por las células del TRH, y es capaz de activar la expresión de los genes *Per*. Altos niveles de Glu en condiciones de O:O podrían modular la expresión de genes reloj a través de las vías utilizadas regularmente para la sincronización, y así alterar  $\tau$ . A su vez la excitotoxicidad del mismo podría alterar las propiedades de red del oscilador, lo que también resultaría en un cambio en el período. IL-1 $\beta$  es capaz de producir cambios en la fase del reloj central y altera la expresión de genes reloj en fibroblastos (Cavadini et al. 2007; Leone et al. 2012), como se describió en el **Capítulo 2**, CCL2 participa en la modulación del reloj en un modelo de activación inmune. De esta manera, estas moléculas, aumentadas en un entorno de glioma, podrían modular el reloj circadiano y producir cambios en sus propiedades endógenas.

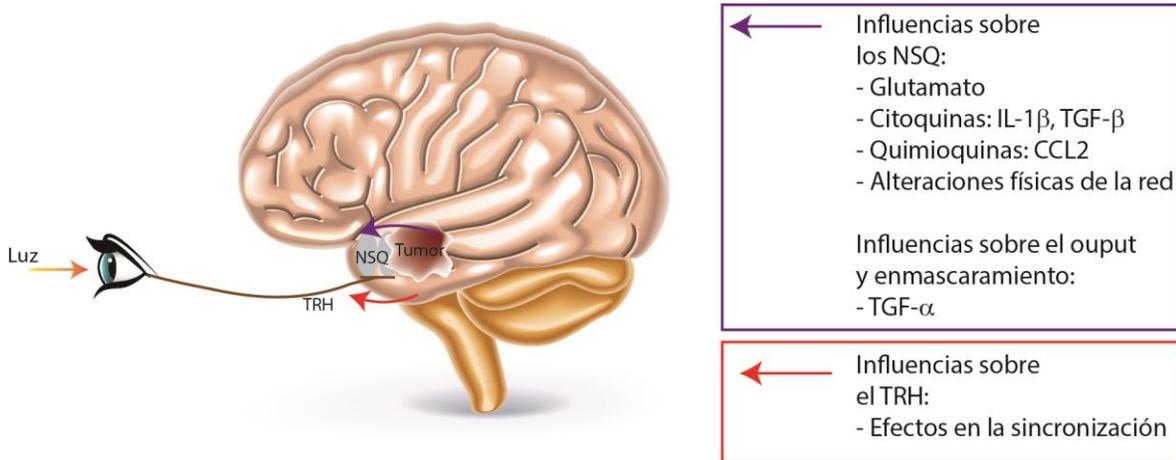
Las alteraciones en la capacidad y forma del oscilador de sincronizarse a ciclos L:O podría estar afectada por los mismos mecanismos que alteran  $\tau$ , y que podrían también alterar la forma y amplitud de la CRF. A su vez, al participar de la vía de sincronización fótica, alteraciones en los niveles de glutamato debidas al desarrollo del tumor podrían causar alteraciones en la estabilidad y robustez de la sincronización. Además, moléculas inmunes como las ya mencionadas IL-1 $\beta$  y CCL2, y otras, como TGF- $\beta$  (que es capaz de producir cambios de fase en los NSQ; Kon et al. 2008), que abundan en el microambiente tumoral, podrían producir cambios en la relación de fase y en la estabilidad de la misma, tal como los que se observan en los animales implantados. Por otro lado, como ya se mencionó, los gliomas presentan en su ambiente TGF- $\alpha$ , el cual es considerado una de las moléculas que median la relación entre los NSQ y los *outputs* del reloj (Kramer et al. 2001). Una desregulación de TGF- $\alpha$  a nivel de los NSQ podría entonces alterar

la manera en la que el reloj se acopla con los mecanismos de control de la actividad locomotora. Además, tal como se describió, TGF- $\alpha$  podría ser también el responsable de modular el mecanismo de enmascaramiento. Por último, cabe notar que en la gran mayoría de los tumores analizados, existía un compromiso de la región que rodea al quiasma óptico, fenómeno común en muchos gliomas pediátricos (Ramanan & Chaseling 2012). La presencia del tumor podría entonces también afectar las vías de entrada del reloj, lo que resultaría en cambios en la capacidad y forma de sincronización del mismo a la luz.

Es importante aclarar que se ha descrito la capacidad de TGF- $\beta$  (Lawler et al. 1994), TGF- $\alpha$  (Humphreys & Hennighausen 2000) y CCL2 (Luini et al. 1994; Mizutani et al. 2009) humanos de unirse a receptores murinos. Esto sugeriría que, incluso si la principal fuente de estas moléculas fuesen las células de origen humano, podrían alterar las vías y mecanismos descritos del reloj circadiano en los ratones.

En resumen, el microambiente de los gliomas altera los niveles de moléculas (la mayoría de ellas también relacionadas con la respuesta inmune) que pueden modular la expresión de genes reloj, activar la vía de sincronización fótica y que participan en el mecanismo de enmascaramiento. Todo esto redundaría en las alteraciones endógenas y de sincronización que se describieron en nuestro modelo. Los efectos de gliomas localizados en zonas cercanas al hipotálamo sobre los ritmos circadianos no han sido analizados en profundidad en pacientes. Existe un reporte de un caso de astrocitoma (glioblastoma o glioma de grado IV) hipotalámico que abarcaba la región de los NSQ de la paciente. Además de otras sintomatologías, asociadas a funciones controladas por el hipotálamo, la paciente presentaba una inversión de los ciclos sueño-vigilia (Haugh & Markesbery 1983). En una línea similar, pacientes pediátricos que padecen de craneofaringiomas (los cuales comúnmente comprometen el tracto óptico y lesionan el hipotálamo), presentan somnolencia durante el día, y alteraciones en los niveles diarios de melatonina (Müller et al. 2002). Resulta entonces interesante plantear el estudio de la influencia de tumores hipotalámicos o de la región del tracto óptico en los ritmos

circadianos, lo que podría redundar en un nuevo factor de seguimiento de la progresión de la enfermedad e incluso de pronóstico acerca de la evolución de la enfermedad.



**Figura 4.4.1. Posibles mecanismos de la alteración circadiana en el modelo de gliomas hipotalámicos.** Los gliomas que se desarrollan en la región del hipotálamo alteran los parámetros endógenos y la capacidad de sincronización. Hemos propuesto que pueden afectar los NSQ (violeta), tanto a nivel de oscilaciones endógenas, de propiedades de red, alterando su respuesta a las vías de sincronización y modulando sus mecanismos de salida y enmascaramiento. Estos efectos se deban probablemente a alteraciones en los niveles de glutamato y de moléculas inmunes. A su vez el tumor puede afectar el Tracto Retinohipotalámico (TRH) y alterar la vía de entrada al reloj (rojo).

#### 4.4.2 Regulación circadiana de la respuesta a TMZ.

Como ya se mencionó, los gliomas, y particularmente los glioblastomas, son uno de los tipos de cáncer con peor pronóstico, con una tasa de supervivencia de no más de 15 meses. La Temozolomida es una nueva droga, de segunda generación, que sufre de una conversión espontánea en condiciones fisiológicas a el agente alquilante 3-metil-(triaceno-1-il)imidazole-4-carboxamida. El tratamiento con TMZ es

capaz de extender la supervivencia de los pacientes con gliomas en unos 3 meses, y es hoy por hoy, el tratamiento quimioterapéutico de elección para esta patología (Oike et al. 2013). Dado que existe una fuerte evidencia señalando ventajas en esquemas de administración de diversos fármacos (incluyendo drogas oncológicas) que consideren la hora del día óptima para el tratamiento (Innominato et al. 2010), nos propusimos investigar si existía un control circadiano en la respuesta de las células LN-229 a la TMZ.

Las células LN-229 transfectadas con un constructo Bmal1-luc mostraron oscilaciones circadianas en la expresión de Bmal1. La expresión circadiana de genes reloj ha sido previamente evaluada en líneas celulares de glioma de rata (Fujioka et al. 2006), en donde las células C6 mostraron un período de 23,5 hs. Los períodos que encontramos en la línea LN-229, de origen humano fueron superiores a los previamente hallados en células de rata. Esto podría deberse o bien a una diferencia pre-existente entre el período de células del CNS de rata y de humano, o a una alteración diferencial entre cada línea debida al proceso de transformación maligna. Más allá de estas diferencias, se determinó que las células LN-229 son capaces de sostener ritmos circadianos en la expresión de genes reloj, y que pueden ser sincronizadas mediante un cambio de medio.

A continuación, evaluamos la existencia de variaciones circadianas en la sensibilidad de las células de glioblastoma LN-229 a la TMZ. Encontramos que la sincronización mediante cambio de medio de cultivo generaba una diferencia en la inhibición de la actividad metabólica (asociada al crecimiento de las células) producida por la TMZ, dependiendo de las horas post-sincronización a las que se administrase. Estos resultados indican que el reloj circadiano de las células LN 229 podría estar modulando la sensibilidad a la TMZ en esta línea de glioma. Se ha descrito recientemente que el principal mecanismo de acción de esta droga es la metilación de ADN, lo que induce daños en el mismo, induce la activación de TAp63 y la consecuente inhibición de cMYC llevando a una disminución en la proliferación e invasión (Yamaki et al. 2013). Como ya se mencionó, el reloj circadiano juega un importante papel en la regulación del ciclo celular y de la reparación de ADN. La vía

de c-Myc, así como la de Wee1 y ciclina-D1 (reguladores de la progresión del ciclo celular, y activables por el daño al ADN), se encuentran bajo regulación circadiana. Particularmente, Fu y colaboradores describieron que el dímero BMAL-CLOCK es capaz de inhibir la expresión de c-Myc (Fu et al. 2005), y además, se ha descrito una correlación entre los niveles oscilantes de Per1 y los de c-Myc en células de neuroblastoma (Repouskou et al. 2010). En este último trabajo, se encontró además que la reducción de c-Myc, causada por la inhibición de las histonas-deacetilasas mediante tratamiento corto (2 hs) con Tricostatin-A, solo ocurría si la droga se administraba en el valle de expresión de c-Myc, pero no en la fase opuesta. En nuestro sistema, el mínimo de expresión de Bmal1 ocurre alrededor de 12 horas luego del cambio de medio (**Figura 4.3.10**), momento en el que la inhibición (actuando a nivel de la transcripción) de c-Myc podría ser mínimo. Esto coincide con el momento en el que la sensibilidad a la TMZ es mínima en las células LN-229 (**Figura 4.3.12**). c-Myc tiene un importante rol en la regulación de la progresión del ciclo celular, influyendo entre otras, en la vía Rb-E2F. La expresión de c-Myc es máxima durante la etapa G<sub>0</sub> en células proliferativas (Persson et al. 1985; Goldsworthy et al. 1994), momento en el que induce la expresión de los genes blanco que llevan a la progresión a través de G<sub>1</sub> y S, y disminuye hasta hacerse mínima durante la fase S. El análisis de la proporción de células en cada fase del ciclo celular mostró que a las 12 HPS ocurría el máximo de porcentaje de células en fase S (**Figura 4.3.12**). Esto podría estar explicado por un aumento de los niveles de c-Myc en las primeras HPS, que llevaría a las células a progresar en el ciclo celular, y encontrarse en mayor cantidad en fase S a 12 HPS. El control circadiano ejerce un importante control sobre la progresión del ciclo celular, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bieler et al. 2014; Matsuo et al. 2003; Feillet et al. 2014), controlando no sólo c-Myc sino también otros factores importantes como Wee y p-21 (Kang et al. 2009). El momento del ciclo celular en el que se administra la TMZ podría también influir en sus efectos, fenómeno que ha sido descrito en otras drogas alquilantes y quimioterapéuticas (Bhuyan et al. 1972; Murray & Meyn 1986).

Finalmente, al analizar los efectos diferenciales de ambos esquemas de administración, pudimos observar que los ritmos en la sensibilidad de TMZ eran

abolidos con esquemas prolongados de 72 horas. Si bien no se realizaron ensayos de cronotoxicidad, las diferencias encontradas con los diferentes esquemas se relacionan con lo observado en ensayos clínicos de cronoterapia: con tratamientos cronomodulados de oxaliplatin en pacientes con metástasis colorrectal, no sólo se observaron mejoras a nivel de toxicidad de la droga, sino que hubo una reducción significativa de los tumores en pacientes que fueron tratados en una fase circadiana en particular, a comparación de los pacientes tratados con esquemas de administración continua (Innominato et al. 2010). En este caso, si bien se trata de una aproximación *in vitro*, las células de glioma que fueron tratadas con esquema agudo presentan similar sensibilidad en la fase circadiana de mayor efecto a esquemas de administración prolongada y continua. Este aspecto de los resultados obtenidos únicamente correlaciona con la efectividad de la droga al tratar a las células tumorales quedando aún por establecer la cronotoxicidad de la TMZ en cultivos celulares no tumorales y las ventajas de un tratamiento cronomodulado *in vivo*.

En resumen, nuestros resultados apuntan a una alteración del sistema circadiano de ratones implantados con gliomas (los cuales afectan un gran número de moléculas que participan en la respuesta inmune), y a un control del reloj sobre la fisiología de los tumores. Esta relación bidireccional puede ser importante tanto en términos del diagnóstico y pronóstico, como para el diseño de tratamientos en este tipo de cáncer.



#### 4.5 Bibliografía.

- Bhuyan, B.K., Scheidt, L.G. & Fraser, T.J., 1972. Cell cycle phase specificity of antitumor agents. *Cancer research*, 32(2), pp.398–407.
- Bieler, J. et al., 2014. Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells. *Molecular systems biology*, 10(7), p.739.
- Von Bossanyi, P. et al., 1998. Correlation of TGF- $\alpha$  and EGF-receptor expression with proliferative activity in human astrocytic gliomas. *Pathology, research and practice*, 194(3), pp.141–7.
- Carrillo-de Sauvage, M.A. et al., 2012. CCL2-expressing astrocytes mediate the extravasation of T lymphocytes in the brain. Evidence from patients with glioma and experimental models in vivo. *PloS one*, 7(2), p.e30762.
- Cavadini, G. et al., 2007. TNF- $\alpha$  suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), pp.12843–8.
- Charles, N. a. et al., 2012. The brain tumor microenvironment. *Glia*, 60(3), pp.502–514.
- Chen, J., McKay, R.M. & Parada, L.F., 2012. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell*, 149(1), pp.36–47.
- Cuddapah, V.A. et al., 2014. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(7), pp.455–65.
- Fang, K.-M. et al., 2011. Expression of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1 in glioma-infiltrating microglia: involvement of ATP and P2X<sub>7</sub> receptor. *Journal of neuroscience research*, 89(2), pp.199–211.
- Feillet, C. et al., 2014. Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(27), pp.9828–33.
- Friedmann-Morvinski, D. et al., 2012. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science (New York, N. Y.)*, 338(6110), pp.1080–4.

- Fu, L. et al., 2005. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell*, 122(5), pp.803–15.
- Fujioka, A., Takashima, N. & Shigeyoshi, Y., 2006. Circadian rhythm generation in a glioma cell line. *Biochemical and biophysical research communications*, 346(1), pp.169–74.
- Gielen, P.R. et al., 2013. Connexin43 confers Temozolomide resistance in human glioma cells by modulating the mitochondrial apoptosis pathway. *Neuropharmacology*, 75, pp.539–48.
- Goldsworthy, T.L. et al., 1994. Expression of myc, fos and Ha-ras associated with chemically induced cell proliferation in the rat liver. *Cell proliferation*, 27(5), pp.269–78.
- Golombek, D. a et al., 2013. The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *Journal of physiology, Paris*, pp.1–13.
- Golombek, D.A. & Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological Reviews*, pp.1063–1102.
- Graeber, M.B., Scheithauer, B.W. & Kreutzberg, G.W., 2002. Microglia in brain tumors. *Glia*, 40(2), pp.252–9.
- Haugh, R.M. & Markesbery, W.R., 1983. Hypothalamic astrocytoma. Syndrome of hyperphagia, obesity, and disturbances of behavior and endocrine and autonomic function. *Archives of neurology*, 40(9), pp.560–3.
- Hoelzinger, D.B., Demuth, T. & Berens, M.E., 2007. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(21), pp.1583–93.
- Humphreys, R.C. & Hennighausen, L., 2000. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene*, 19(8), pp.1085–91.
- Innominato, P.F., Lévi, F. a & Bjarnason, G. a, 2010. Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology. *Advanced drug delivery reviews*, 62(9-10), pp.979–1001.
- Kaminska, B., Kocyk, M. & Kijewska, M., 2013. TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis. *Advances in experimental medicine and biology*, 986, pp.171–87.

- Kang, T.-H. et al., 2009. Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), pp.2864–7.
- Kon, N. et al., 2008. Activation of TGF-beta/activin signalling resets the circadian clock through rapid induction of Dec1 transcripts. *Nature cell biology*, 10(12), pp.1463–9.
- Könnecke, H. & Bechmann, I., 2013. The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas. *Clinical & developmental immunology*, 2013, p.914104.
- Kramer, A. et al., 2001. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5551), pp.2511–5.
- Lawler, S. et al., 1994. The murine type II TGF-  $\beta$  receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF-  $\beta$  1. , 175, pp.165–175.
- Le, D.M. et al., 2003. Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(10), pp.4034–43.
- Leone, M.J. et al., 2012. Role of proinflammatory cytokines on lipopolysaccharide-induced phase shifts in locomotor activity circadian rhythm. *Chronobiology international*, 29(6), pp.715–23.
- Li, R. et al., 2010. IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncology reports*, 23(6), pp.1553–9.
- Liu, Q. et al., 2010. IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *Journal of neuro-oncology*, 100(2), pp.165–76.
- Lowrey, P.L. & Takahashi, J.S., 2011. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. *Advances in genetics*, 74, pp.175–230.
- Luini, W. et al., 1994. Species-specificity of monocyte chemotactic protein-1 and -3. *Cytokine*, 6(1), pp.28–31.
- Magge, S.N. et al., 2009. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in migration of neural progenitor cells toward glial tumors. *Journal of neuroscience research*, 87(7), pp.1547–55.

- Marques, M.D., 2002. Ritmos biológicos y ciclos ambientales: sincronización. In D. A. Golombek, ed. *Cronobiología humana*. Bernal: Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes, pp. 123–134.
- Maruno, M. et al., 1997. Distribution of endogenous tumour necrosis factor alpha in gliomas. *Journal of clinical pathology*, 50(7), pp.559–62.
- Matsuo, T. et al., 2003. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5643), pp.255–9.
- Meini, A. et al., 2008. A nitric oxide/Ca(2+)/calmodulin/ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the mitogenic effect of IL-1beta in human astrocytoma cells. *British journal of pharmacology*, 153(8), pp.1706–17.
- Miller, C.R. & Perry, A., 2007. Glioblastoma. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(3), pp.397–406.
- Mizutani, K. et al., 2009. The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11(11), pp.1235–42.
- Müller, H.L. et al., 2002. Melatonin secretion and increased daytime sleepiness in childhood craniopharyngioma patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(8), pp.3993–6.
- Murray, D. & Meyn, R.E., 1986. Cell cycle-dependent cytotoxicity of alkylating agents: determination of nitrogen mustard-induced DNA cross-links and their repair in Chinese hamster ovary cells synchronized by centrifugal elutriation. *Cancer research*, 46(5), pp.2324–9.
- Oike, T. et al., 2013. Radiotherapy plus concomitant adjuvant temozolomide for glioblastoma: Japanese mono-institutional results. *PloS one*, 8(11), p.e78943.
- Paugh, B.S. et al., 2009. Interleukin-1 regulates the expression of sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(6), pp.3408–17.
- Persson, H., Gray, H.E. & Godeau, F., 1985. Growth-dependent synthesis of c-myc-encoded proteins: early stimulation by serum factors in synchronized mouse 3T3 cells. *Molecular and cellular biology*, 5(11), pp.2903–12.
- Pollard, J.W., 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 4(1), pp.71–8.
- Ramanan, M. & Chaseling, R., 2012. Paediatric brain tumours treated at a single, tertiary paediatric neurosurgical referral centre from 1999 to 2010 in Australia.

- Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 19(10), pp.1387–91.
- Rana, S. & Mahmood, S., 2010. Circadian rhythm and its role in malignancy. *Journal of circadian rhythms*, 8, p.3.
- Repouskou, A. et al., 2010. The circadian expression of c-MYC is modulated by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in synchronized murine neuroblastoma cells. *Chronobiology international*, 27(4), pp.722–41.
- Ryuto, M. et al., 1996. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *The Journal of biological chemistry*, 271(45), pp.28220–8.
- Savvidis, C. & Koutsilieris, M., 2012. Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Molecular medicine*, 18, pp.1249–60.
- Schlegel, U. et al., 1990. Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas. *Oncogene*, 5(12), pp.1839–42.
- Sciumè, G., Santoni, A. & Bernardini, G., 2010. Chemokines and glioma: invasion and more. *Journal of neuroimmunology*, 224(1-2), pp.8–12.
- Straif, K. et al., 2007. Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *The Lancet Oncology*, 8(12), pp.1065–1066.
- Wang, H. et al., 2009. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27(10), pp.2393–404.
- Watkins, S. & Sontheimer, H., 2012. Unique biology of gliomas: challenges and opportunities. *Trends in neurosciences*, 35(9), pp.546–56.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S. & Kay, S. a, 2010. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual review of physiology*, 72, pp.551–77.
- Wen, P.Y. & Kesari, S., 2008. Malignant gliomas in adults. *The New England journal of medicine*, 359(17), pp.492 – 507.
- Yamaki, T. et al., 2013. Temozolomide suppresses MYC via activation of TAp63 to inhibit progression of human glioblastoma. *Scientific reports*, 3, p.1160.
- Yeung, Y.T. et al., 2013. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *British journal of pharmacology*, 168(3), pp.591–606.

- Yeung, Y.T. et al., 2012. p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells. *Journal of neuro-oncology*, 109(1), pp.35–44.
- Yoshimura, T. et al., 1989. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *The Journal of experimental medicine*, 169(4), pp.1449–59.
- Yoshino, Y. et al., 2006. Activation of p38 MAPK and/or JNK contributes to increased levels of VEGF secretion in human malignant glioma cells. *International journal of oncology*, 29(4), pp.981–7.
- Zhu, V.F. et al., 2012. Understanding the role of cytokines in Glioblastoma Multiforme pathogenesis. *Cancer letters*, 316(2), pp.139–50.
- Zong, H., Verhaak, R.G.W. & Canoll, P., 2012. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert review of molecular diagnostics*, 12(4), pp.383–94.

# **Discusión y Conclusiones Generales**



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

### 5. Discusión y Conclusiones Generales.

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio de los efectos de alteraciones en variables inmunológicas sobre el sistema circadiano. Nos aproximamos desde caminos y enfoques muy diversos, investigando tanto los sustratos celulares (**Capítulo 1**) y moleculares (**Capítulo 2**) que median los efectos de la activación inmune transitoria, como los efectos de modelos menos específicos de alteración inmune prolongada local en el SNC (**Capítulo 3**).

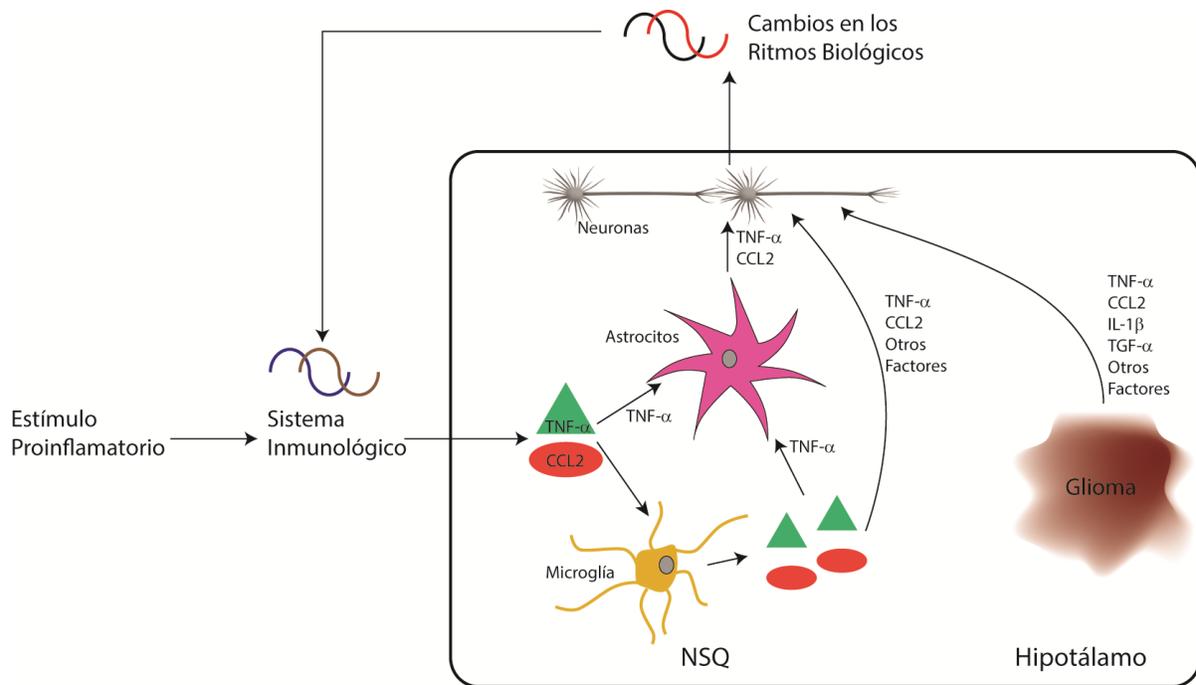
Nuestros resultados apuntan a una participación importante de la citoquina TNF- $\alpha$  y de la quimioquina CCL2 en la respuesta del reloj a estímulos inmunes transitorios. Ambas moléculas se inducen en los NSQ en respuesta a LPS periférico, y su bloqueo inhibe los efectos de la endotoxina sobre el reloj, además, son secretadas por los astrocitos en respuesta a la activación transitoria con TNF- $\alpha$ , y los niveles de sus receptores son máximos en el momento del día en el que el reloj es sensible a estímulos inmunes. Cabe preguntarse cuál es el rol particular de cada molécula, y cuál es su blanco de acción en los NSQ. Si bien tanto CCL2 y TNF- $\alpha$  son secretados por los astrocitos de NSQ, sólo se detectó la expresión del receptor de TNF- $\alpha$  en estas células. Esto podría apuntar a que los astrocitos detectarían originalmente un aumento de TNF- $\alpha$  en los NSQ y, en respuesta a esto, activarían la liberación de diversas moléculas proinflamatorias, como CCL2 y TNF- $\alpha$  mismo, amplificando la señal inflamatoria. Resta, sin embargo, entender el rol de dos otros importantísimos tipos celulares: la microglía y las neuronas. La generación de una señal de salida coherente desde los NSQ depende de la actividad neuronal, con lo que, sin importar los pasos previos, la señal de la activación inmune debe llegar a estas células. La microglía es el tipo celular más sensible a la activación inmune. En nuestro modelo, estas células podría activarse ante niveles muy bajos de señales proinflamatorias, y ser las encargadas de liberar la primer ola de factores proinflamatorios. En particular TNF- $\alpha$  sería detectado por los astrocitos y activaría la secreción de más moléculas inmunes. La posición y función de los astrocitos, le permiten modular eficientemente el funcionamiento neuronal, con lo que esta

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

activación astrocitaria sería la que lleva a las alteraciones en el reloj molecular (o en las propiedades de acoplamiento) de las neuronas de los NSQ, produciendo los cambios de fase (**Figura A**).

De manera análoga, nuestro estudio utilizando los gliomas hipotalámicos como modelo de alteración inmune local mostró la sensibilidad del sistema circadiano a la misma. Se observaron dos efectos importantes: un cambio en el período endógeno de los animales (con inestabilidad del mismo a lo largo de los días), y dificultades a la hora de mantener una relación de fase coherente con el *zeitgeber*. En este caso, las posibles alteraciones causadas por el tratamiento, a nivel del SNC, son menos específicas e involucrarían la presencia de diversos factores, y un ambiente donde coexisten señales proinflamatorias con un fenotipo anti-inflamatorio y pro-proliferativo (**Figura A**). Nuevamente, muchas de las vías y señales que se han descrito que se activan en los modelos de glioma, poseen la capacidad de alterar el funcionamiento del reloj, destacándose IL-1 $\beta$ , TGF- $\alpha$  y - $\beta$  y CCL2 y el glutamato. Cabe destacar que, incluso en estadios avanzados de la enfermedad, el reloj fue capaz de generar ritmos circadianos en la actividad locomotora (a pesar de tener gran parte de la masa encefálica comprometida), demostrando la robustez de los NSQ como osciladores.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES



**Figura A. Interacción entre el sistema inmune y el reloj biológico.** El oscilador circadiano es sensible a la activación inmune. Un estímulo proinflamatorio es capaz de activar al Sistema Inmunológico, lo que desencadena el aumento de TNF- $\alpha$  y CCL2 en los NSQ. Esta señal puede ser amplificada por la microglía, y luego actuar directamente sobre las neuronas, o, en el caso de TNF- $\alpha$ , activar a los astrocitos de los NSQ lo cuales pueden modular el funcionamiento neuronal, vía TNF- $\alpha$  (y posiblemente CCL2). A su vez, los gliomas hipotalámicos, que alteran prolongadamente el balance de citoquinas y factores inmunes, también alteran el funcionamiento del reloj, y su capacidad de sincronizarse a la luz. Los cambios en los ritmos biológicos pueden impactar también en las oscilaciones y funciones del sistema inmune, permitiendo una coordinación bidireccional entre ambos sistemas.

Como conclusión general de nuestros resultados encontramos entonces que el reloj circadiano central de mamíferos es sensible a factores inmunes. Cabe finalmente preguntarse acerca de la validez adaptativa de la sensibilidad del reloj

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

circadiano a los factores asociados a la respuesta inmune. Como ya se describió, el sistema inmunológico se encuentra bajo un estricto control del reloj circadiano y la respuesta rítmica del mismo determina la progresión de varios modelos de desafío inmunológico. En condiciones fisiológicas, podría resultar importante entonces que exista un mecanismo de *feedback*, por el cual el sistema inmune pudiese modular al reloj, acoplando las oscilaciones de salida (inmunes) con el oscilador central de modo de permitir un control más fino y robusto de las mismas (**Figura A**). Por otro lado, en condiciones patológicas, la sensibilidad del reloj circadiano podría ser parte de un mecanismo general englobado en el *sickness behavior*, que incluye diversos cambios comportamentales y estarían asociados a un aislamiento y disminución general de la actividad y de otros patrones de comportamiento, que redundarían en menores chances de diseminación de la enfermedad a otros miembros de la especie y en un menor gasto energético.

La investigación acerca de los mecanismos que median la respuesta del reloj a estímulos proinflamatorios puede allanar el camino hacia un entendimiento integral del sistema neuroinmune. Como vimos es importante acercarse desde un enfoque bidireccional, ya que ambos sistemas (el circadiano y el inmunológico) son capaces de dialogar con el otro.

Hemos recorrido un largo camino plagado de relojes, fuegos y estrellas. Nuestra relación con el tiempo es difícil de definir, pero, como vimos, se inmiscuye hasta en los más recónditos mecanismos de nuestro ser.

# Créditos



## CRÉDITOS

### Créditos.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- “Modulation of mammalian circadian rhythms by Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha”. Paladino N, Mul Fedele ML, Duhart JM, Marpegan L, Golombek DA. *Chronobiology International*. 31(5):668-79. Junio 2014.
- “Suprachiasmatic astrocytes modulate the circadian clock in response to TNF- $\alpha$ ”. Duhart JM, Leone MJ, Paladino N, Evans JA, Castanon-Cervantes O, Davidson AJ, Golombek DA. *The Journal of Immunology*. 191(9): 4656-4664. Noviembre 2013. Destacado en la sección “*In this Issue*” de la revista.
- “The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease”. Golombek DA, Casiraghi LP, Agostino PV, Paladino N, Duhart JM, Plano SA, Chiesa JJ. *J Physiol Paris*. 107(4): 310-322. Septiembre 2013.
- “Role of astrocytes in the immune-circadian signaling”. Duhart JM, Marpegan L, Leone MJ, Golombek DA. *Advances in Neuroimmune Biology*. 4(2): 85-96. Agosto 2013.
- “Characterization of locomotor activity circadian rhythms in athymic nude mice”. Paladino N\*, Duhart JM\*, Mul Fedele ML, Golombek DA. *J. Circadian Rhythms*. 1;11(1):2. Febrero 2013. (\*: Primera autoría compartida).
- “Role of proinflammatory cytokines in LPS-induced phase shifts in locomotor activity circadian rhythms”. Leone MJ, Marpegan L, Duhart JM, Golombek DA. *Chronobiol International*. 29(6):715-23. Julio 2012.

## CRÉDITOS

Los siguientes trabajos se encuentran en preparación y serán enviados en el transcurso de 2015:

- "Ccl2 participates in the response of the circadian clock to immune stimuli". Duhart JM, Brocardo L, Golombek DA.

- "Circadian rhythms in glioma cells modulate the sensitivity to temozolomide" Brocardo L\*, Duhart JM\*, Marpegan L, Cardama G, Golombek DA.

- "Hypothalamic gliomas produce mild alterations in circadian activity rhythms in mice" Duhart JM,\* Brocardo L\*, Marpegan L, Golombek DA.

# **Anexo 1**

**Caracterización de los ritmos de actividad locomotora en ratones atímicos *nude***



### **Anexo 1. Caracterización de los ritmos de actividad locomotora en ratones atímicos *nude*.**

#### **A1. Introducción.**

Como se mencionó en el Capítulo 3, existe un gran volumen de trabajo indicando que las alteraciones en los ritmos biológicos y en los patrones diarios de actividad y reposo, están asociados con el desarrollo tumoral. Se comentó también la reciente búsqueda de terapias cronomoduladas que sean benéficas tanto en términos de la efectividad de la droga, como en la disminución de efectos tóxicos de la misma. Por otro lado, hemos descripto también que los efectores inmunes pueden tener importantes efectos sobre los ritmos circadianos.

Los ratones mutantes  $Foxn1^{\Delta/\Delta}$  (*nude*) tienen un defecto específico en el desarrollo del timo, caracterizado por un bloqueo de la diferenciación de las células epiteliales de este órgano, lo que resulta en la producción de linfocitos T con funcionalidad anormal (Xiao & Manley 2010). Los ratones *nude* se utilizan con muchísima frecuencia en la investigación oncológica porque ofrecen la posibilidad de implantar tumores xenogénicos, y, más particularmente, líneas tumorales humanas (Kerbel 2003).

Dado entonces el creciente interés en los efectos del reloj circadiano en la progresión tumoral, y en los efectos de alteraciones inmunes en el reloj, nos propusimos caracterizar los ritmos de actividad locomotora en ratones *nude*, y en su correspondiente cepa control.

#### **A2. Materiales y Métodos.**

Se utilizaron ratones machos adultos jóvenes (2 meses de edad) de la cepa Swiss Webster (N:NIHS) *Wt* o mutantes  $Foxn1^{\Delta/\Delta}$  (*nude*). Los animales se mantuvieron con ventilación, agua y alimento estériles, en jaulas individuales equipadas con sensores infrarrojos de actividad. Se utilizaron esquemas de L:O de 12:12 horas y condiciones de O:O, en las cuales la manipulación de los animales se realizó bajo luz tenue roja.

La actividad locomotora se registró mediante el sistema Archron® versión 2.1, diseñado en nuestro Laboratorio, colectando las cuentas acumuladas cada 5 minutos. El tiempo es expresado como ZT en condiciones de L:O y como CT en O:O, tal como se definió previamente en este trabajo. Para los experimentos de pulsos de luz, los animales mantenidos en O:O se expusieron a un pulso de 10 minutos o de 2 horas de luz blanca de 150 luxes, tanto a CT 15, como a CT 22. Los avances abruptos en el ciclo de L:O se realizaron avanzando la hora de apagado

## ANEXO 1 – RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES NUDE

de las luces, y acortando el período de noche. Por otro lado, los retrasos abruptos en el ciclo L:O se realizaron retrasando la hora de encendido de las luces, incrementando el período de noche.

La inmunohistoquímica contra c-Fos se realizó tal como se describió en el Capítulo 1 (Sección 2.2.7). Los cerebros se extrajeron 60 minutos luego de un pulso de luz a CT 15.

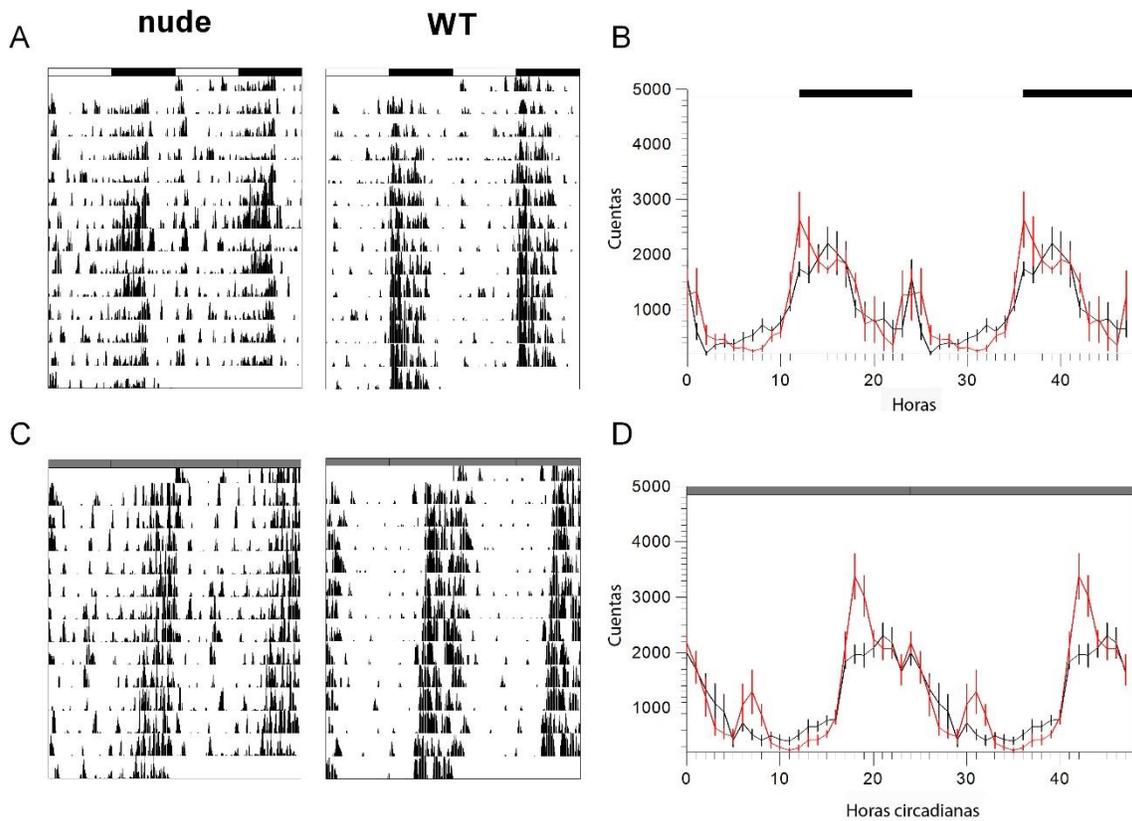
Todos los parámetros circadianos se analizaron con el software El Temps. El cálculo de ángulo de fase ( $\psi$ ), velocidad de resincronización a jet-lag y período endógeno ( $\tau$ ) se realizaron tal como se describió en el **Capítulo 3** (sección 4.2.5) y los cambios de fase como se describió en el **Capítulo 1** (sección 2.2.11). Con el fin de mejorar la visualización y el análisis de los patrones de actividad, se realizaron waveforms individuales en las que se agrupó la actividad por cada hora (reloj o circadiana) y se utilizaron para el análisis de la distribución de actividad, tanto en O:O (duración de la noche ( $\alpha$ ) y días subjetivos ( $\rho$ )), como en L:O (porcentaje de actividad en distintos intervalos). La contribución de cada intervalo, tanto en O:O, como en L:O se realizó según la sección 4.2.5, del Capítulo 3.

Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. Las diferencias entre los grupos se analizaron con la prueba t de Student o la prueba no-paramétrica de Mann Whitney, según correspondiese. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p < 0,05$ .

### A3. Resultados.

El patrón general de actividad en L:O es similar entre la cepa Wt y los ratones nude. Ambos grupos exhibieron un episodio de actividad que ocurre luego del apagado de las luces y que dura 2 -3 horas (**Figura A1 A y B**). Para analizar la contribución de cada intervalo de actividad, se dividió el día en cuatro períodos: ZT 12 -23 (noche), ZT 23 -3 (transición día – noche), ZT 3 -10 (día) y ZT (10 -12) (actividad anticipatoria al apagado de la luz). No encontramos diferencias significativas entre los ratones Wt y nude en el porcentaje de la actividad total correspondiente a cada intervalo (**Tabla A1**). El ángulo de fase fue también similar entre ambas cepas de ratones (**Tabla A1**).

# ANEXO 1 – RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES NUDE



**Figura A1. Patrones generales de actividad en ratones nude y Wt. A) y C)** Se muestran actogramas representativos de animales nude (izquierda) y Wt (derecha), en condiciones de L:O (A) y de O:O (C). **B) y D)** Se muestran *waveform* promedio para animales nude (negro) y Wt (rojo) en condiciones de L:O (B) y de O:O (D).

		Nude (media ± EEM)	Wt (media ± EEM)	p
	$\psi$ (min)	8.7 ± 6.3	8.1 ± 3.1	ns
%Area	Intervalo			
	ZT12-23	64.54 ± 3.43	65.68 ± 6.82	ns
	ZT23-3	12.37 ± 2.17	14.81 ± 4.00	ns
	ZT3-10	13.49 ± 1.69	10.22 ± 1.75	ns
	ZT10-12	8.11 ± 1.13	6.85 ± 1.71	ns

## ANEXO 1 – RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES NUDE

**Tabla A1 (Página anterior). Parámetros de ritmos de actividad en L:O.** Ángulo de fase ( $\gamma$ ) y porcentaje de actividad para cada intervalo (respecto a la actividad total). El p valor corresponde a la prueba t de Student entre los grupos nude (n = 9) y Wt (n = 6).

Los patrones generales de actividad en O:O en ambas cepas fueron también similares, sin diferencias en  $\tau$ ,  $\alpha$ ,  $\rho$  ni  $\alpha/\rho$  (**Tabla A2**). Sólo se observó que el porcentaje de la actividad total que era parte del día subjetivo fue ligeramente mayor en los ratones nude ( $p < 0,05$ , prueba t de Student, **Tabla A2**).

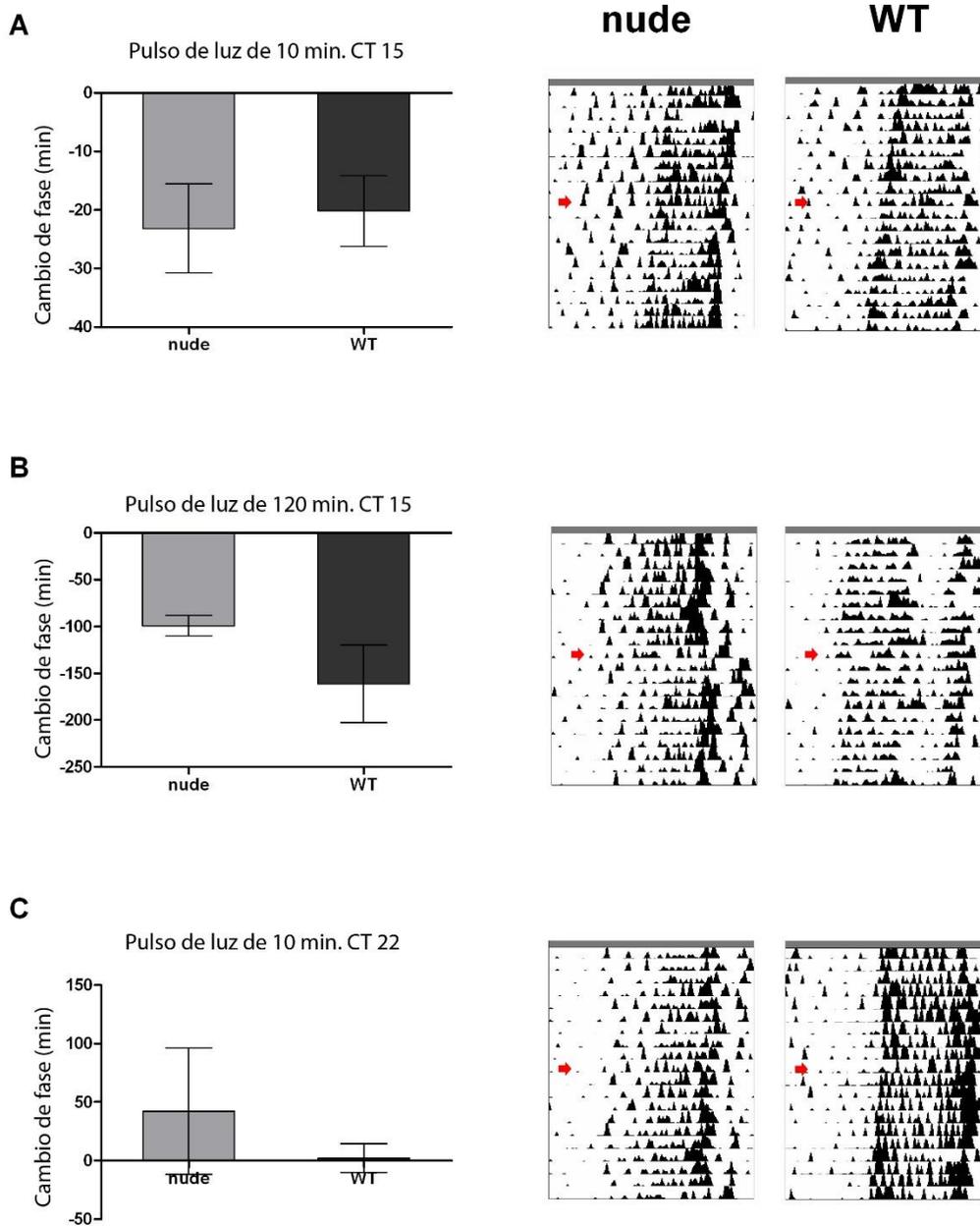
	Nude	Wt	p
$\tau$ (horas)	23.86 $\pm$ 0.03	23.88 $\pm$ 0.05	ns
$\alpha$ (horas)	8.7 $\pm$ 0.6	10.8 $\pm$ 1.5	ns
% Área ( $\alpha$ )	66.1 $\pm$ 3.5	79.9 $\pm$ 3.7	< 0.05
$\alpha/\rho$	0.58 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.27	ns

**Tabla A2. Parámetros de los ritmos de actividad locomotora en O:O.** Se presentan el período endógeno (t), la duración del día subjetivo (a), el porcentaje de la actividad total ocurriendo durante a (% área a) y la relación entre la duración del día y la noche subjetiva (a/r). Los p valores corresponden a la prueba t de Student entre el grupo de animales nude (n = 9) y el control Wt (n = 6).

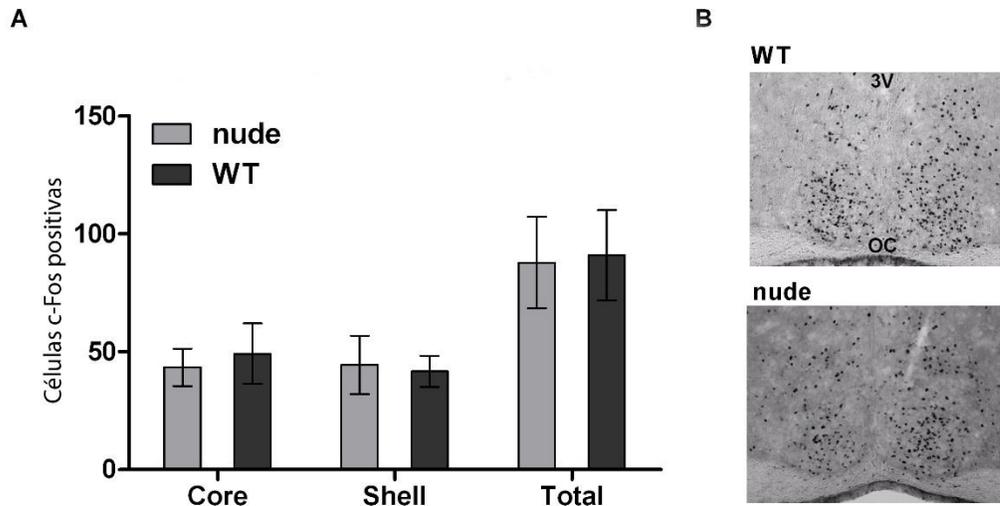
A continuación analizamos la respuesta de los animales nude a diferentes tratamientos con luz. Se evaluaron los cambios en la fase del ritmo de actividad locomotora producidos por pulsos de luz de distinta duración (10 y 120 minutos), tanto durante la noche temprana (CT 15, que produce retrasos), como durante la noche tardía (CT 22, que produce adelantos). Ambas cepas respondieron de manera similar a todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellas (**Figura A2**). También se analizó la inducción de c-Fos (gen de inducción temprana en la respuesta fótica del reloj) luego de pulsos de 10 min administrados a CT 15.

## ANEXO 1 – RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES NUDE

Ambas cepas mostraron una activación similar de las células de los NSQ, sin diferencias significativas en el número de células c-Fos positivas (**Figura A3**).



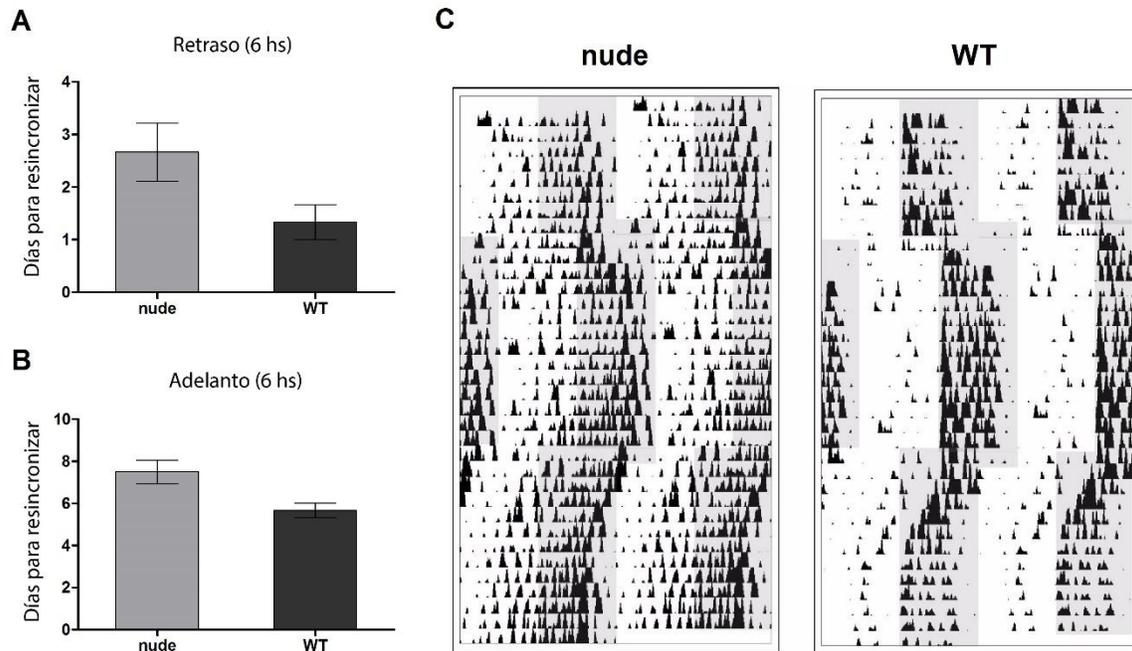
**Figura A2. Cambios de fase inducidos por pulso de luz.** Ratones nude o control (Wt) fueron sometidos a pulsos de luz durante la noche subjetiva temprana (**A** y **B**) o durante la noche subjetiva tardía (**C**). **Panel derecho:** se muestran actogramas representativos de cada grupo de animales, recibiendo los tratamientos descriptos. **Panel izquierdo:** la comparación mediante la prueba Mann Whitney mostró que no hay diferencias significativas entre los animales nude y Wt en ninguno de los tratamientos testeados (n = 3 para cada grupo).



**Figura A3. Inducción de c-Fos en los NSQ en respuesta a pulso de luz. A)** Número de células positivas para c-Fos en los NSQ de ratones nude y Wt, cuantificadas 60 minutos después de un pulso de luz a CT 15. No se observaron diferencias significativas entre cada los grupos en ninguna de las dos sub-regiones de los NSQ (Core y Shell), ni al considerar el total de las células (prueba de Mann Whitney,  $p > 0,05$ ,  $n = 3$ ).

Finalmente, la capacidad de resincronización de ambos grupos de animales a cambios abruptos en el ciclo L:O (jet-lag) mostró que los animales nude poseen una tendencia a demorar más días para adaptarse al nuevo ciclo L:O, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figura A4**).

## ANEXO 1 – RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES NUDE



**Figura A4. Resincronización a cambios abruptos en el ciclo L:O.** Animales nude y Wt fueron sometidos a un cambio abrupto de 6 horas en el esquema de L:O y se cuantificaron la cantidad de días necesarios para resincronizarse al nuevo esquema. **A)** Tiempo en días necesarios para resincronizarse a un retraso de 6 horas en el ciclo L:O ( $2,7 \pm 0,5$  y  $1,3 \pm 0,2$  días para animales nude y Wt, respectivamente;  $p > 0,05$  prueba de Mann Whitney;  $n = 6$  para el grupo nude y  $n = 3$  para el grupo Wt). **B)** Tiempo en días necesarios para resincronizarse a un adelanto de 6 horas en el ciclo L:O ( $7,5 \pm 0,5$  y  $5,7 \pm 0,2$  días para animales nude y Wt, respectivamente;  $p > 0,05$  prueba de Mann Whitney;  $n = 6$  para el grupo nude y  $n = 3$  para el grupo Wt). **C)** Actogramas representativos de ratones nude y Wt sometidos primero a un jet-lag por retrasos de 6 horas y, 15 días más tarde, a un jet-lag por adelantos de 6 horas. El fondo gris representa el período de oscuridad.

### A4. Conclusiones.

Si bien existía un reporte previo analizando los patrones de actividad locomotora de ratones atímicos en L:O (Beau et al. 1990), en el mismo sólo se estudiaron 3 días de registro. Nuestro trabajo amplía estos resultados analizando además los patrones de actividad en condiciones constantes, y la respuesta a estímulos fóticos en estos animales. Nuestros resultados indican que las profundas alteraciones en el sistema inmune de los ratones nude no modifica los ritmos circadianos de actividad locomotora, sugiriendo que la falta de linfocitos T funcionales (o cualquier otra diferencia fenotípica) no produce cambios en el control circadiano de la actividad locomotora. Sin embargo, resta investigar los efectos de la mutación  $Foxn1^{\Delta/\Delta}$  en otras variables rítmicas. Estos hallazgos son relevantes, tanto en

## ANEXO 1 – RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES NUDE

términos del creciente interés respecto a la modulación circadiana por parte de efectores inmunes, como por el uso de los ratones nude en la investigación oncológica, particularmente en los enfoques que involucren terapias cronomoduladas y disrupciones circadianas.

### A5. Bibliografía.

Beau, J., Lévi, F. & Motta, R., 1990. The influence of the athymic mutation nude on the components of the circadian rhythm of activity in mice. *Chronobiology international*, 7(5-6), pp.371–6.

Kerbel, R.S., 2003. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer biology & therapy*, 2(4 Suppl 1), pp.S134–9.

Xiao, S. & Manley, N.R., 2010. Impaired thymic selection and abnormal antigen-specific T cell responses in Foxn1( $\Delta/\Delta$ ) mutant mice. *PloS one*, 5(11), p.e15396.

## Anexo 2

### Introducción al Sistema Inmunológico



## **Anexo 2. El sistema inmunológico: una brevísima introducción.**

La principal función del sistema inmune es la de proteger al organismo de la invasión de agentes externos, sea partículas u organismos. De esta manera, la clave del éxito para el funcionamiento del sistema inmune es la habilidad de distinguir lo “propio” de lo “extraño”. Esta distinción se basa en la capacidad de reconocer antígenos, o sea una sustancia (o parte de ella), que es capaz de desencadenar una respuesta inmune.

Los mecanismos que permiten el reconocimiento de estructuras microbianas, tóxicas o alergénicas puede dividirse en dos categorías generales: a) la inmunidad innata, una respuesta rápida que se monta al reconocer moléculas o patrones que pueden estar compartidos por muchos agentes patógenos, y que no están presentes en el hospedador; y b) la inmunidad adaptativa, en la que las respuestas que están mediadas por moléculas de unión a antígenos, que poseen una gran especificidad para estructuras únicas de patógenos particulares. Dado que los receptores utilizados para el reconocimiento en la inmunidad adaptativa se expresan en un amplio número de células, este sistema está preparado para actuar de manera rápida, mientras que en la inmunidad adaptativa, las células que poseen el receptor específico se encuentran en bajo número, y deben proliferar antes de poder montar una respuesta efectiva. Una característica fundamental de la inmunidad adaptativa es la de producir células que persisten en un estado de aparente dormancia, por un tiempo muy prolongado, pero que pueden re-expresar funciones efectoras rápidamente ante un nuevo encuentro con su antígeno específico. Esto le da a la respuesta adaptativa la capacidad de manifestar memoria inmunológica, lo que le permite reaccionar más efectivamente a patógenos específicos cuando aparecen por segunda vez, incluso si esto ocurre décadas más tarde del primer encuentro.

La respuesta innata incluye barreras físicas, tales como la piel, el mucus presente en epitelio respiratorio y en los tractos gastrointestinal y genitourinal, e

incluso la acción de los cilios que “barren” esta capa de mucus, permitiendo que se renueve luego de que se haya contaminado con partículas inhaladas o ingeridas. A su vez, la inmunidad innata incluye proteínas solubles y pequeñas moléculas bioactivas, que pueden estar presentes constitutivamente (tales como las proteínas de la cascada de complemento) o que se liberan de células especializadas, una vez que son activadas. Entre estas últimas encontramos las citoquinas, que pueden regular el funcionamiento de otras células, las quimioquinas, que pueden reclutar leucocitos inflamatorios a la región en la que son secretadas, y también mediadores lipídicos de la inflamación, radicales libres activos, aminas bioactivas, y enzimas. El sistema de inmunidad innata cuenta con receptores de membrana y proteínas citoplasmáticas que se unen a patrones moleculares expresados en la superficie de los patógenos invasivos. Entre estos encontramos a los receptores tipo Toll (TLRs, de *Toll like receptor*), de los que existen varios subtipos que se unen a diferentes moléculas presentes en los patógenos, como por ejemplo TLR-4 que es capaz de reconocer el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de las bacterias gram -. La inmunidad innata está llevada a cabo por células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas), y por las células NK.

- Los *macrófagos* son células de gran tamaño, que fagocitan y degradan organismos, y además pueden funcionar como células presentadoras de antígenos a otros componentes del sistema inmune. Los precursores circulantes en sangre y linfa de los macrófagos se denominan monocitos.

- Los *neutrófilos* están presentes en la sangre y en la médula ósea, migran hacia el sitio de infección en respuesta a determinados factores liberados por otras células y participan activamente de la eliminación de patógenos.

- Las *células dendríticas*: residen en los tejidos periféricos, al ser activadas, tras fagocitar patógenos, migran a los nódulos linfáticos donde cumplen su función principal (la presentación de antígenos y el inicio de la respuesta adaptativa).

- Las *células NK*, son células citotóxicas, capaces de liberar una gran cantidad de factores que alteran la membrana de los patógenos, destruyéndolos. El

mecanismo de reconocimiento que poseen estas células no se encuentra aun completamente caracterizado.

En cuanto a la respuesta adaptativa, la misma se desencadena una vez que se ha activado la respuesta innata. Los linfocitos B son productores de anticuerpos y pueden generar células de memoria. Cada linfocito B expresa anticuerpos que reconocen específicamente un único antígeno (generalmente en su forma nativa) y pueden dar origen a células plasmáticas (productoras de anticuerpos) y a células de memoria (que pueden reactivarse por la exposición al estímulo y originar nuevamente células plasmáticas y de memoria). Los linfocitos T pueden clasificarse en CD4 o CD8 positivos, y cada uno de estos subtipos se divide en al menos dos grupos. Los linfocitos T CD4+ se clasifican en T CD4+ *helpers* (TH, estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos y a otros tipos de células T a diferenciarse) y en T CD4+ de hipersensibilidad (que participan en el reclutamiento de fagocitos). Los linfocitos T CD8+ se subdividen en células T citotóxicas (que expresan receptores específicos para antígenos pequeños) y linfocitos T supresores (regulan la respuesta inmune).

### **La respuesta inflamatoria. *Fire...walk with me*<sup>1</sup>.**

Cuando se establece una infección en el cuerpo, el propósito del sistema inmune es controlarla o erradicarla. La reacción inicial del sistema inmune a una infección depende tanto del sitio en el cual se haya iniciado la invasión, como de la naturaleza del patógeno. Pueden existir muchos detonantes que lleven al sistema inmune a activarse, como por ejemplo:

- Si la invasión es en un área del cuerpo que se encuentre defendida por macrófagos, como los pulmones o intestinos, estas células serán la primera línea de defensa. Fagocitan y digieren los organismos invasores y, a través de la presentación de antígenos, estimulan otras células del sistema inmune.

---

<sup>1</sup> De la serie "Twin Peaks", creada por David Lynch. 1990.

- En algunos casos, el primer reconocimiento está dado por el sistema de complemento, que además de atacar a los patógenos, producen moléculas capaces de reclutar y activar células del sistema inmune.
- El invasor puede ser también reconocido por el sistema inmune adaptativo, es decir por los linfocitos B o T.

Todos los mecanismos descritos tienen la capacidad de inducir la migración de células fagocíticas al sitio de invasión. Una vez que alcanzan este sitio, las células fagocíticas se activan y comienzan su tarea de digerir y destruir a los patógenos invasores. Asimismo, una vez activados también producen una variedad de citoquinas, que activan aún más otras células del sistema inmunológico. En este sentido, la reacción inmune inicial activa una cascada de reacciones inmunitarias. En la Tabla 1.3 se resumen las moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria.

El primer efecto de la respuesta inflamatoria sobre el cuerpo es el incremento de la circulación sanguínea alrededor del área infectada, dado por la vasodilatación en los sitios cercanos a la inflamación. Hay también un incremento en la temperatura corporal localizada en el sitio de infección, que puede por si mismo tener un efecto antibiótico. De esta manera, los síntomas más comunes de la inflamación son:

- Los tejidos del área se tornan rojos, con aumento del calor. Esto se debe al incremento del flujo sanguíneo en la región.
- Los tejidos se hinchan, nuevamente debido al incremento de la sangre presente en la región.
- Se produce el dolor en el área afectada, tanto por la presencia de mediadores del dolor, como por la compresión de las células nerviosas producto de la hinchazón.

Una vez que el proceso inflamatorio comienza, continúa hasta que la infección que lo desencadenó se ha erradicado. La resolución de la reacción inflamatoria es importante, para evitar el daño excesivo al tejido afectado. Esto se logra mediante

la activación del mecanismo de apoptosis en las células inmunes involucradas en el proceso inflamatorio, concomitantemente con la activación inmune. El proceso apoptótico se evita gracias a señales enviadas por las células TH, mientras estas reconozcan antígenos extraños en el sitio de inflamación. Una vez que los patógenos se han erradicado, al no detectar antígenos extraños, las células TH dejan de enviar las señales de supervivencia las demás células inmunes y las mismas entran en apoptosis.

Citoquinas y quimioquinas que median la respuesta inmune. Actividades más importantes sobre células inmunes.

<b>CITOQUINAS</b>	<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Proinflamatorias. Promueven activación de macrófagos. Activación de endotelio. Inducen liberación de IL-6 y TNF $\alpha$
	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	
	<b>IL-1Ra</b>	Anti-inflamatorio. Antagonista endógeno de IL-1.
	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Proinflamatoria. Induce activación endotelial. Favorece inflamación localizada. Induce la liberación de IL-1 e IFN. Citotóxica.
	<b>IL-6</b>	Proinflamatoria. Induce respuesta de fase aguda. Activación de linfocitos. Aumento de producción de anticuerpos.
	<b>IL-2</b>	Proinflamatoria. Induce proliferación de células T
	<b>IL-4</b>	Proinflamatoria. Activación de células B. Favorece <i>switch</i> a IgE y respuestas Th2.
	<b>IL-10</b>	Inmunosupresora. Potente inhibidor de funciones de macrófagos.
	<b>IL-17A</b>	Proinflamatoria. Dispara la producción de IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ .
	<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Promueve activación de macrófagos. Estimula proliferación y diferenciación de linfocitos B.
	<b>IFN<math>\alpha</math> - IFN<math>\beta</math></b>	Inhiben replicación viral y crecimiento tumoral. Modulan la producción de anticuerpos
	<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Induce angiogenesis
	<b>TGF<math>\beta</math></b>	Anti-inflamatoria. Induce cicatrización y angiogénesis
	<b>HMGB1</b>	Proinflamatoria. Actúa sobre los receptores TLR4. Inducida tardíamente en sepsis.

ANEXO 2 – INTRODUCCIÓN AL SISTEMA INMUNOLÓGICO

	<b>MIF</b>	Proinflamatoria. Activa macrófagos y células T. Funciona como link con sistema endócrino.
<b>QUEMOQUINAS</b>	<b>IL-8</b>	Factor quimioattractante de neutrófilos, basófilos y células T al sitio de infección
	<b>GM-CSF</b>	Estimula crecimiento y diferenciación de linaje mieloide, particularmente células dendríticas.
	<b>JE (MCP1)</b>	Atrae monocitos favoreciendo su conversión en macrófagos. Induce liberación de histamina por basófilos. Favorece respuesta de tipo Th2.
	<b>MIP1<math>\alpha</math></b>	Antiviral. Promueve inmunidad Th1.
	<b>MIP2</b>	Promueve quimiotaxis y degranulación de neutrófilos.
	<b>RANTES</b>	Atrae y activa diferentes leucocitos, incluidas células T. Inflamación crónica. Induce degranulación de basófilos